

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par **UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences des Procédés – Sciences des Aliments
Et de l'unité de recherche QualiSud - CIRAD

Spécialité **: Biochimie, chimie et technologie agroalimentaire**

Présentée par **Pedro Gustavo Maldonado Alvarado**

FACTEURS DÉTERMINANTS DU POUVOIR DE PANIFICATION DE L'AMIDON DE MANIOC MODIFIÉ PAR FERMENTATION ET IRRADIATION UV

Soutenue le 21 mai 2014

devant le jury composé de

M. Philippe PICCERELLE, Professeur, Aix-Marseille Université	Président
M. Jean-Louis DELARBRE, Professeur, Université Montpellier 1	Directeur de thèse
Mme. Camille MICHON, Professeur, AgroParisTech	Rapporteur
Mme. Gaëlle ROUDAUT, Maître de Conférences, AgroSup	Rapporteur
M. Thierry TRAN, Chercheur, CIRAD, Thaïlande	Examinateur
Mme. Lidwine GROSMAIRE, Maître de Conférences, Université Montpellier 1	Examinateur
M. Dominique DUFOUR, Chercheur, CIRAD, Cali	Invité

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H È S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline : Biochimie, chimie et technologie agroalimentaire

École Doctorale Sciences des Procédés - Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

Pedro Gustavo Maldonado Alvarado

Février 2014

Titre

FACTEURS DÉTERMINANTS DU POUVOIR DE PANIFICATION DE L'AMIDON DE MANIOC MODIFIÉ PAR FERMENTATION ET IRRADIATION UV

JURY

Pr. Philippe Piccerelle	Aix-Marseille Université	Président
Pr. Jean-Louis Delarbre	Université Montpellier 1	Directeur de Thèse
Pr. Camille Michon	AgroParisTech, Massy	Rapporteur
Pr. Gaëlle Roudaut	Agrosup, Dijon	Rapporteur
Dr. Thierry Tran	CIRAD, Thaïlande	Examinateur
Dr. Lidwine Grosmaire	Université Montpellier 1	Examinateur
Dr. Dominique Dufour	CIRAD, Cali	Invité

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu au Pr. Jean-Louis Delarbre pour m'avoir accordé sa confiance et accueilli au sein de son équipe. Merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles et dirigé avec tant de sagesse et de gentillesse. Ma sincère gratitude pour leur tolérance et leur engagement personnel tout au long de cette thèse.

Mes remerciements aussi au Dr. Thierry Tran qui m'a encadré avec tant de compétence et rigueur scientifique dont il fait preuve pour interpréter les résultats. Ma reconnaissance pour son exigence du travail bien fait et sa patience indiscutables. Merci pour leurs contributions inestimables dans le cadre de cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma sincère reconnaissance au Dr. Lidwine Grosmaire qui a co-encadré cette thèse, pour son aide précieuse et sa contribution très importante dans la réalisation et l'accompagnement pendant cette thèse. Un merci très spécial pour leurs corrections de ce travail et pour leur empathie.

J'adresse ma plus respectueuse reconnaissance au Pr. Camille Michon et au Pr. Gaëlle Roudaut pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps consacré à l'examen de ce mémoire. Les suggestions pertinentes qu'ils ont faites sur ce travail de thèse ont contribué à améliorer le manuscrit final.

Je remercie vivement le Pr. Michèle Delalonde pour m'avoir encadré dans l'aspect porosité ainsi que le Dr. Agnès Rolland-Sabaté pour son aide en ce qui concerne la digestibilité enzymatique et la cristallinité par diffraction aux rayons X. Votre professionnalisme et compétences sont de la plus haute qualité et votre générosité incomparable.

Ces remerciements seraient incomplets, sans exprimer ma reconnaissance au Dr. Dominique Dufour dont l'initiative est à l'origine de ce projet de thèse. Un grand merci pour son orientation et ses conseils avisés dans les moments décisifs de cette thèse dont son analyse critique approfondie, sa vision stratégique et son expérience ont été à toute épreuve.

Un grand merci à « l'équipe du CIRAD » et plus particulièrement à Olivier Gilbert, Christian Mestres, Julien Ricci « Juliensito » pour leur aide au laboratoire et leurs conseils constructifs. Merci beaucoup Thierry Goli pour tout l'appui dans les moments difficiles de la thèse et pour partager la belle passion de la guitare ! A Nadine Lopez « notre maman du CIRAD » pour les attentions et le soutien de toujours.

A « l'équipe du CIAT », « muchas gracias » pour l'accueil dans mon séjour à Cali, notamment au Dr. Dominique Dufour, Teresa Sánchez « Tere », Andrés Giraldo et Andrés Escobar « hermanito » pour m'avoir initié à la culture de l' « almidón agrio ».
Je tiens à remercier tout particulièrement ma stagiaire Léa pour son implication dans son

travail de Master qui a permis des avancées significatives du projet. Je lui souhaite la plus grande réussite.

J'adresse mes vifs sentiments de gratitude à la SENESCYT (Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación) de mon pays l'Equateur pour m'avoir attribué une bourse de trois années et demi pour mes études de thèse. L'opportunité de faire le doctorat en France dans les meilleures conditions.

Je remercie profondément tous les amis, les doctorants et les stagiaires que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de cette thèse. Merci à Nadia, pour sa bonté réflexive ; à Manuela, pour son sens de l'initiative ; à Joseph, pour sa motivation ; à Ameziane et Guilhem pour leur philosophie holistique. À Pedro V., pour sa « caballerosidad », à Didier, pour sa chaleur humaine antillaise. J'ai une pensée particulière pour vous, merci pour vos encouragements.

Je voudrais adresser un merci très spécial à tous mes amis qui m'ont accompagné de façon inconditionnelle. Je remercie du fond du coeur Rómulo, pour ta maturité et tes conseils ; Sopha, pour ta sympathie et ton charisme « parisien-vietnamien » ; Jérémie, pour être un gentleman en tout moment ; Christophe, pour ta bonne humeur « sudiste ». Renzo, « hermano », pour ton énergie spirituelle et ta joie « azteca » de vivre ; Elvira, pour ta tendresse et ta délicatesse « andaluza » ; Andrés, pour ta noblesse d'esprit et ton positivisme « rasta colombiano » ; Paola, pour ton amabilité « uruguaya » et ta passion pour « el tango » ; Marina, pour ton sens de l'humour et ton authenticité « madrileña » ; Victor, pour être un attentif español-montpelliérain fanatique du cinéma ; Ana, pour ta générosité, pour ta compagnie.

À KAMINEROS, David Gaël, hermano, pour ta belle musique et tes paroles politiques engagées qui m'ont donné l' « espoir » et m'ont obligé à faire l' « aller-retour » « direction les étoiles » « au milieu de ce monde » pour amener ma guitare et participer à ce beau projet latino - « français ». À Yoshio, pour ta génialité musicale « mexico-japonaise », pour ta composition et production magnifiques. À Franck, pour ta musicalité « montpelliéraine » rassurée et ta rythmique parfaite. La musique qui nous accompagne chaque jour, jusqu'au dernier souffle, ne nous quittera jamais. Adelante siempre !

Enfin, merci à ma famille pour tout l'appui et soutien..
Un grand merci à ma grande sœur Diana, à mon beau-frère Eric pour toute leur affection et compréhension, à mes nièces Sofía et Inés, les bijoux de la famille. À mes parents qui ont été de tous les combats, pour leur soutien inestimable, pour la foi aveugle déposée en moi et pour ne s'être jamais plaints : je ne vous remercierai jamais assez pour votre amour inconditionnel. À mon père pour ton goût pour les sciences, ton leadership éthique, tes principes d'aide aux autres. A ma mère pour les gênes musicaux, la sagesse, la prudence.

À mes parents

Table des Matières.

LISTE DES FIGURES.

Liste des Tableaux.

I. INTRODUCTION

Introduction.

Le manioc (*Manihot esculenta*) est un arbuste vivace originaire d'Amérique Centrale et Amérique du Sud (Léotard *et al.*, 2009; Olsen & Schaal, 1999) produisant des tubercules comestibles. Cette plante pousse dans les régions équatoriales, entre le tropique du Cancer et le tropique du Capricorne (BeMiller & Whistler, 2009). De par le caractère périssable de cette racine (conservation en frais après récolte inférieure à 48 heures), la production de la fécule de manioc est une voie de valorisation très intéressante pour allonger la conservation et réduire les pertes post-récolte (Bertolini, 2000). En Asie, Afrique et Amérique du Sud, l'amidon et la farine de manioc sont d'importantes productions commerciales (FAO, 2000) et servent d'aliment de base surtout aux populations économiquement défavorisées (FAO, 2006).

La production et la consommation de manioc sont importantes pour les pays de la zone tropicale. Aujourd'hui, environ 250 millions de tonnes/an sont produites dans le monde (**Figure 1**) (FAO, 2013) avec plus de 800 millions de consommateurs principalement en Afrique sub-saharienne, Amérique latine et Asie (Shore, 2002) où ce tubercule contribue considérablement au maintien de la sécurité alimentaire (FAO, 2000; Shore, 2002). La production d'amidon dans le monde est d'environ 25 millions de tonnes/an d'amidon natif et 8 millions de tonnes/an d'amidon modifié. Les amidons de maïs et de manioc figurent en tête avec 15,5 et 8,0 millions de tonnes/an, respectivement, suivis par les amidons de pomme de terre et de blé avec 1,5 et 1,0 millions de tonnes/an. Les principaux producteurs sont la Thaïlande, l'Indonésie, la Chine, le Vietnam, le Brésil et l'Inde (Stapleton, 2012). Actuellement, la source la plus importante d'amidon traitée dans les marchés internationaux est celle du manioc (Stapleton, 2012). L'exportation mondiale d'amidon de manioc est de 1,8 millions de tonnes/an, soit 811 millions d'euros. La Thaïlande est le premier exportateur avec 94% de l'exportation mondiale (**Tableau 1**) (FAO, 2013).

L'amidon de manioc présente des spécificités remarquables par rapport aux autres amidons. Il montre un faible taux de matières résiduelles (matières grasses, protéines, cendres), et des poids moléculaire élevés en amylose et amylopectine (Swinkels, 1985). De plus, le phosphore contenu dans l'amidon de manioc en faible quantité est partiellement amovible (V. Singh & Ali, 1987) et, par conséquent, n'est pas lié sous forme d'ester de phosphate comme dans l'amidon de pomme de terre. Par ailleurs, les propriétés fonctionnelles de l'amidon de manioc en font un ingrédient populaire dans l'industrie agroalimentaire, particulièrement pour sa clarté de gel, son gonflement et sa rétention d'eau (Niba, Bokanga, Jackson, Schlimme, & Li, 2002; J. Singh, Kaur, & McCarthy, 2007), sa viscosité élevée et sa bonne résistance à la réfrigération ou congélation, ce qui le rend comparable à l'amidon cireux du blé (Moorthy, 2002).

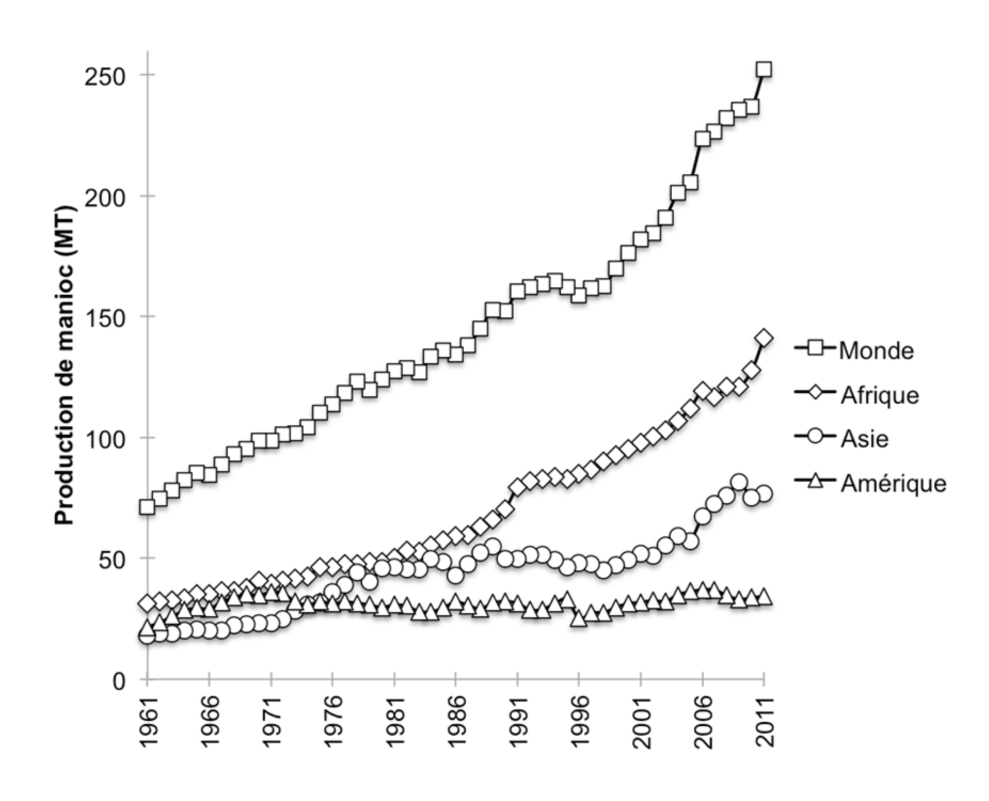


Figure 1. Production de manioc dans le monde (FAO, 2013)

Tableau 1. Principaux pays exportateurs d'amidon de manioc en 2010 [a]

Pays	Quantité (T)	Valeur (k€) [b]
Monde entier	1808752	612642
Thaïlande	1694245	568214
Chine	34308	10733
Indonésie	23814	9649
Paraguay	21273	7296
Cambodge	13723	1861
Equateur	4034	161
Brésil	3759	2913

[a] Source FAO (2013)

[b] Calcul sur la base 1 USD équivalent à 0,7551 € (taux de change en 2010)

Depuis plusieurs années, la consommation de pain à base de blé augmente fortement dans de nombreux pays, notamment les pays en voie de développement, en raison de l'augmentation de la population, de l'urbanisation ou des changements d'habitudes alimentaires. Cependant, nombre de ces pays, pour des raisons climatiques, ne peuvent pas ensemencer le blé approprié à la panification. Ils dépendent donc d'importations coûteuses pour des économies en développement (Eggleston, Omoaka, & Ihedioha, 1992). Les premières tentatives pour réduire ces couts visaient à la substitution partielle de la farine de blé avec des farines de cultures indigènes comme le manioc, le yam, le sorgho, le millet, etc.

Ces expériences ont été dirigées par l'établissement du programme de farine composite de la FAO en 1964 (Kent, 1985). Néanmoins, lorsque les mélanges contiennent plus de 30% de farine de manioc, l'acceptabilité par le consommateur diminue, notamment à cause de différences notables au niveau de la couleur, la texture ou du goût (FAO, 2004). Ainsi, la modification de l'amidon de manioc est nécessaire pour surmonter les particularités indésirables de l'amidon natif et donc d'améliorer les caractéristiques du produit (Sriroth, Piyachomwan, Sangseethong, & Oates, 2002).

En Amérique du Sud, une alternative traditionnelle en panification est la substitution de la farine du blé par l'amidon de manioc modifié par fermentation et irradiation UV du soleil (Cereda (1973) et Westby & Cereda (1994) au Brésil et Cárdenas & De Buckle, (1980) et Zakhia, Dufour, Chuzel, & Griffon (1996) en Colombie). Cette modification influence fortement les caractéristiques physicochimiques et organoleptiques (Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000; Mestres & Rouau, 1997; Numfor, Walter, & Schwartz, 1995) reliées à une excellente capacité de panification (Bertolini, Mestres, Lourdin, Valle, & Colonna, 2001; Dufour, Brabet, Zakhia, & Chuzel, 1995; Franco *et al.*, 2010; Marcon *et al.*, 2009) en l'absence de gluten (Bertolini, Mestres, & Colonna, 2000; Marcon *et al.*, 2009).

Ce type de modification de l'amidon de manioc est connu sous le nom d'amidon aigre (« Polvilho azhedo » au Brésil ou « almidón agrio » en Colombie) (Lacerda *et al.*, 2005; Mestres & Rouau, 1997). Dans ces pays, le processus de fabrication comprend principalement trois étapes : l'extraction de l'amidon, la fermentation naturelle pendant environ 30 jours et le séchage solaire pendant 12 heures (Westby & Cereda, 1994; Zakhia *et al.*, 1996). Cependant, ces traitements restant encore empiriques, le pouvoir de panification de l'amidon aigre demeure d'une qualité très irrégulière sur le marché (Dufour *et al.*, 1995) et souvent imprévisible (Dufour, Larsonneur, Alarcon Morante, Brabet, & Chuzel, 1996). Localement, l'amidon est essentiellement utilisé pour la production de pain et pâtisseries. Par ailleurs, ce produit peut être utilisé comme adjuvant en panification ou comme ingrédient principal pour la production de pains sans gluten. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes traduisant la capacité de panification de l'amidon aigre est essentielle.

Des travaux importants ont été effectués en ce sens (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Camargo, Colonna, Buleon, & Richard-Molard, 1988; Demiate *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 1995; Gomes, Mendes da Silva, & Ricardo, 2005; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997; Plata-Oviedo & Camargo, 1998). La plupart des études ont porté sur les effets des traitements de fermentation et séchage au soleil sur le comportement en panification de l'amidon aigre ainsi que certaines propriétés physicochimiques telles que le pH, la solubilité, le volume spécifique, le degré de polymérisation par des mesures de viscosité intrinsèque (Marcon *et al.*, 2009); le degré d'oxydation de l'amidon par des mesures de teneurs en

carbonyle et carboxyle (Guerra-Dias *et al.*, 2011); les propriétés thermomécaniques de la pâte de l'amidon (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001); les longueurs d'onde et temps d'exposition optimaux (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Vatanasuchart, Naivikul, Charoenrein, & Sriroth, 2005). Les résultats de ces études suggèrent que l'amidon est dégradé (hydrolysé partiellement) lors de la fermentation et que le séchage au soleil joue un rôle clé dans la capacité de panification. Cependant, la nature de ces modifications n'a pas été encore complètement élucidée (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Dufour *et al.*, 1995; Marcon *et al.*, 2009).

Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer la relation entre la dégradation de l'amidon et la capacité de panification. Tout d'abord au niveau moléculaire, la formation de radicaux libres par exposition aux UV pourrait oxyder et finalement dépolymériser l'amidon (Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Demiate *et al.*, 2000; Guerra-Dias *et al.*, 2011; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997), avec éventuellement un effet catalytique des acides organiques (acide lactique en particulier) produits au cours de la fermentation. Deuxièmement au niveau supramoléculaire, la structure du grain d'amidon serait altérée au cours de la fermentation, modifiant le comportement lors de la gélatinisation (Camargo *et al.*, 1988; Dufour *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2005; Onitilo, Sanni, Oyewole, & Maziya-Dixon, 2007).

Cependant, d'autres facteurs comme les effets génétiques et géographiques (altitude de culture) semblent jouer un rôle déterminant sur la panification, en plus des traitements post-récolte (extraction, fermentation et séchage solaire). A ce jour, la majorité des travaux se sont concentrés sur l'étude d'une ou deux variétés sans tenir compte des différences génétiques (Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009; Mestres, Boungou, Akissoë, & Zakhia, 2000; Mestres & Rouau, 1997) et seules quelques publications ont exploré l'influence du génotype du manioc sur la capacité de panification (Escobar, Dufour, Sanchez, Giraldo, & Dufour, 2009; Onitilo *et al.*, 2007). Par ailleurs, Escobar *et al.* (2009) ont mis en évidence pour la première fois l'influence de l'altitude à laquelle le manioc est cultivé sur la capacité de panification. De plus, les connaissances traditionnelles des agriculteurs ont souvent indiqué que les facteurs génétiques et climatiques agissent sur la capacité de fabrication de pain.

De ce fait, la nécessité d'approfondir les recherches sur l'influence du génotype et de l'altitude de culture, en plus de l'effet des traitements post-récolte, comme possibles facteurs déterminants de la capacité de panification, est mise en avant. L'originalité de ce travail de thèse est l'étude détaillée de l'impact des facteurs génétiques sur la capacité de panification de l'amidon aigre de manioc en utilisant 13 génotypes colombiens cultivés dans les mêmes conditions en deux localités d'altitudes différentes. Ainsi, 3 génotypes ont été cultivés à une altitude moyenne (1000 mètres par rapport au niveau de la mer) et 10 génotypes à une

altitude élevée (1700 m.p.n.m.) et qui sont dénommés comme variétés de plaine et d'altitude, respectivement. Ces génotypes ont été soumis à 4 traitements différents de fermentation (0 ou 30 jours) et de séchage (four ou soleil). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de contribuer à une meilleure compréhension des propriétés de l'amidon aigre de manioc et notamment de déterminer l'importance relative des effets du génotype, de l'altitude et des procédés (amidons fermentés *versus* amidons natifs) sur la capacité de panification.

Ce manuscrit comprend une première partie consacrée à la revue bibliographique dans laquelle ce travail trouve ses fondements. Cette partie détaille dans un premier temps la structure de l'amidon et le comportement du grain d'amidon en milieu aqueux. Par la suite, les modifications de l'amidon de manioc par fermentation et irradiation UV et leurs propriétés sont développées. Finalement, la panification de l'amidon aigre comparé à celle de l'amidon du blé est abordée.

La seconde partie présente les matériaux et méthodes utilisés dans ce travail. En premier, nous traitons de l'origine et de la préparation des échantillons pour les analyses. Les protocoles des techniques ainsi que les analyses statistiques utilisées sont ensuite développés.

La troisième partie concerne les résultats obtenus de ce travail ainsi que leur discussion. La première section traite de la caractérisation physico-chimique et structurelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil. La caractérisation fonctionnelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil est présentée par la suite en deuxième partie. Le troisième volet concerne aux caractérisations complémentaires pour vérifier les différences de structure des granules après traitements de fermentation et séchage au soleil.

Finalement en quatrième partie, les conclusions et perspectives de ce travail sont proposées.

II. TRAVAUX ANTÉRIEURS.

2.1. L'amidon

L'amidon est la deuxième plus grande biomasse produite sur la terre (Jane, 2006), après la cellulose. C'est le polysaccharide le plus important qui se trouve dans tous les organes des végétaux supérieurs (BeMiller & Whistler, 2009).

L'amidon est une macromolécule de stockage d'énergie sous forme de carbohydrates (BeMiller & Whistler, 2009). C'est le principal composant des granules de céréales et des tubercules tropicaux (Moorthy, 2002), notamment dans le manioc, où il est très abondant (65-70% base sèche) (Alves, 2002).

L'amidon se présente sous forme de granules dans les cellules des plantes (Jane, 2006; Zobel, 1988a, 1988b). Cette macromolécule fournit 70-80% des calories consommées par les êtres humains dans le monde (BeMiller & Whistler, 2009; Thomas & Atwell, 1988).

2.1.1. Structure de l'amidon.

2.1.1.1. Structure moléculaire de l'amidon

Chimiquement l'amidon est un polymère de sucres (polyose), composé d'unités de glucose reliées entre elles par une liaison glucosidique α-D-1,4 (Guilbot & Mercier, 1985). Il a été établi depuis longtemps que l'amidon est un composé hétérogène constitué principalement d'un mélange de deux polymères l'amylose et l'amylopectine (Banks & Greenwood, 1975; French, 1984; Guilbot & Mercier, 1985; Thomas & Atwell, 1988).

2.1.1.1.1. L'amylose

L'amylose est un polymère de glucose essentiellement linéaire (Thomas & Atwell, 1988) (**Figure 2**), avec une faible proportion de ramifications (environ entre 4 et 20 ramifications par molécule (Buléon, Colonna, Planchot, & Ball, 1998; Hoover, 2001)) liées par des liaisons α-1,6 (Curá, Jansson, & Krisman, 1995; Thomas & Atwell, 1988). Le nombre de ramifications de la molécule d'amylose dépend de la taille moléculaire et de la source botanique de l'amidon (Hizukuri, Takeda, Yasuda, & Suzuki, 1981; Takeda, Shirasaka, & Hizukuri, 1984). Cependant, ces ramifications n'auraient pas d'influence sur le comportement hydrodynamique de l'amylose (Sivak & Preiss, 1998; T. L. Wang, Bogracheva, & Hedley, 1998).

La teneur en amylose varie considérablement selon l'origine et les modifications génétiques de l'amidon. Elle peut varier de 0 à plus de 75% (Moorthy, 2002). Son poids moléculaire peut varier de 10^5 à 10^6 $g.mol^{-1}$ (Hizukuri, Takeda, Maruta, & Juliano, 1989; Morrison & Karkalas, 1996; Roger & Colonna, 1993). L'amylose native contient 500 à 5000 glycosyle. La longueur des chaînes varie au sein d'un même amidon selon une distribution statistique. Le **Tableau 2** présente les principales propriétés de l'amylose de l'amidon du manioc.

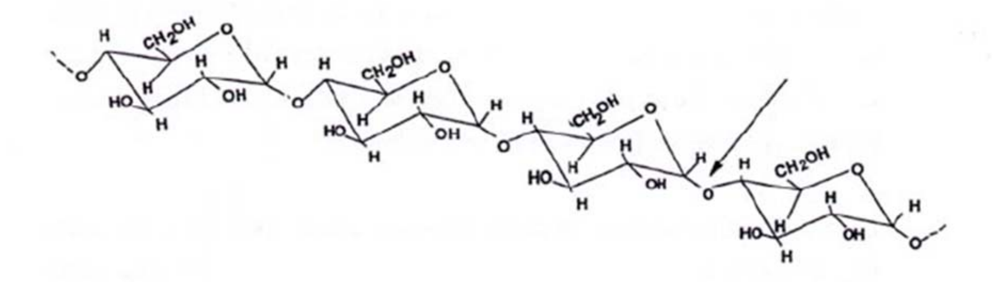


Figure 2. Structure de l'amylose. (D'après Buléon, Colonna, & Leloup (1990))

La complexation de l'amylose

Une caractéristique de l'amylose est sa capacité de complexation avec des molécules hydrophobes comme des acides gras libres (glycérides), certains alcools et l'iode (Fennema, 1996).

Dans la complexation acide gras-amylose, l'amylose forme une hélice dont la surface externe est hydrophile et le centre hydrophobe et dans l'axe de laquelle s'insère la chaîne d'acide gras par interactions hydrophobes (Carlson, Larsson, Dinh-Nguyen, & Krog, 1979) (**Figure 3**).

La complexation de l'amylose par les lipides dépend du degré de polymérisation de l'amylose, de la longueur des acides gras et des températures de complexation. Les chaînes longues d'amylose induisent la formation de plus de complexes avec les lipides et améliorent leur thermostabilité (Gelders, Vanderstukken, Goesaert, & Delcour, 2004). La structure des complexes formés varie cependant en fonction de la température à laquelle la complexation se réalise.

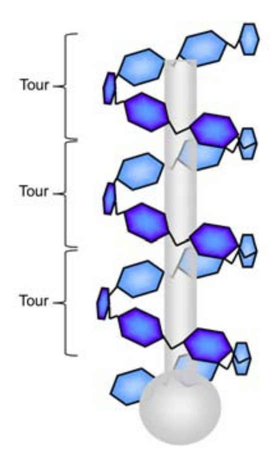


Figure 3. Schématisation d'un complexe amylose (en bleu) – lipide (D'après Putseys, Lamberts, & Delcour (2010).

Tableau 2.

Propriétés de l'amylose des amidons de différentes origines botaniques

Amidon	Teneur (%)	Masse Moléculaire (10^5 g.mol^{-1})	Degré de polymérisation (DPn)	Masse du degré de polymérisation (DPw)	DP de distribution apparent	Viscosité limite (η-mL.g^{-1})	Références
Manioc	14-26[a]	2,3[f]	2600[ego]	6680[ngq]	580 - 22400[ngq]	384[ngq]	[a] (Sánchez *et al.*, 2009)
	17[b]	4,3[g]	2660[o]	7710[h]		465[h]	[b] (Swinkels, 1985)
	17,8[c]	5,2 et 12,5[h]	3642[k]				[c] (Jane *et al.*, 1999)
Pomme	16,9[c]	7,0[i]	2100 - 4920[ng]	5130 - 6360[ng]	560 - 21800[ing]	368 - 384[ng]	[d] (L. Wang & Wang, 2001)1)
de terre	21[b]	8,7[j]	4070[h]	5170[h]	840 - 21800[op]	420[h]	[e] (Takeda, Hizukuri, & Juliano, 1987)
	23,8[d]	9,0[k]					[f] (Ciacco & D'Appolonia, 1977)
Maïs	28[b]	20[l]	960[o]	2550[o]	390 - 13100[o]	169[o]	[g] (Takeda *et al.*, 1984)
	27,5[d]		990[p]		400 - 14700[p]	183[p]	[h] (Susuki, Takeda, & Hizukuri, 1985)
	22,5[c]						[i] (Roger & Colonna, 1996)
Blé	28[b]	3,9[k]	1290[o]	2360 - 5450[r]	460 - 18200[p]	118 - 237[p]	[j] (Meuser, Manners, & Seibel, 1995)
	25,8[c]	5,1[i]	980 - 1570[p]				[k] (Ong, Jumel, Tokarczuk, Blanshard, & Harding, 1994)
		5,8[j]					
Riz	15-19[e]	0,1-5,2[m]	920 - 1100[o]	2750 - 3320[o]	210 - 12900[o]	180 - 216[o]	[l] (Fiedorowicz, Tomasik, You, & Lim, 1999)
	21,8[d]		920 - 1040[p]		320 - 11700[p]	180 - 249[p]	
	20,5[c]						[m] (Ramesh, Mitchell, Jumel, & Harding, 1999)
							[n] (Hizukuri & Takagi, 1984)
							[o] (Morrison & Karkalas, 1990)
							[p] (Takeda, Hizukuri, Takeda, & Suzuki, 1987)
							[q] (Emiola & Delarosa, 1981)
							[r] (Shibanuma, Takeda, Hizukuri, & Shibata, 1994)

Une autre propriété de l’amylose est sa capacité à former des gels après la cuisson du granule d’amidon (gélatinisation et empesage) (Thomas & Atwell, 1988).

2.1.1.1.2. L’amylopectine

L’amylopectine est le principal composant de la plupart des variétés d’amidons (70 – 80%) (Banks & Greenwood, 1975; Duprat, Gallant, Guilbot, Mercier, & Robin, 1980). L’amylopectine est formée par l’association de résidus D-glucopyranoses (15 à 35 glucoses) reliés entre eux par des liaisons α-1,4 en chaînes linéaires branchées les unes aux autres par des liaisons linéaires α-1,6 (Duprat *et al.*, 1980; Hoover, 2001; Thomas & Atwell, 1988) (**Figure 4**). Le taux de branchement est d’environ 5 – 6% (BeMiller & Whistler, 2009; Duprat *et al.*, 1980; Thomas & Atwell, 1988). L’amylopectine comprend plus de 20000 ramifications par molécule (Thomas & Atwell, 1988).

Cette macromolécule est classiquement représentée selon une structure « en grappe » où les chaînes linéaires connectées par des liaisons α-1,6 sont classifiées en fonction de leur longueur :

A) chaînes courtes S (short) (12<DP<20), B) chaînes longues (L) (30<DP<45) et C) chaînes supérieures à 60 DP.

Les chaînes A « externes » sont liées au reste de la molécule uniquement par leur extrémité réductrice. Les chaînes B « intermédiaires » sont liées au reste de la molécule par une extrémité réductrice et d’autre part, branchées à une autre chaîne par une liaison α-1,6. La chaîne C « centrale » porte uniquement l’extrémité réductrice de l’amylopectine (BeMiller & Whistler, 2009). 80 – 90% du nombre total de chaînes dans une molécule d’amylopectine présentent des chaînes latérales, tandis que les 10 – 20% de chaînes restantes forment les connexions inter-chaîne (Manners, 1989).

Le ratio amylose:amylopectine dans l’amidon impacte considérablement les propriétés fonctionnelles de l’amidon (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012; Thomas & Atwell, 1988). Il dépend des conditions de culture et de la variété d’origine de l’amidon (Würzburg, 1986). En général, la littérature estime l’amidon de manioc comme possédant des ratios entre 17:83 (BeMiller & Whistler, 2009; Rolland-Sabaté *et al.*, 2012; Thomas & Atwell, 1988) et 22:78 (Wuttisela, Shobsngob, Triampo, & Triampo, 2008). Cependant, les ratios pour les génotypes de manioc cireux sont de l’ordre de 0:100 (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012, 2013). Le **Tableau 3** présente les principales propriétés de l'amylopectine de l'amidon du manioc.

Du point de vue structural et fonctionnel, l’amylopectine – par rapport à l’amylose – a un rôle important, du fait de sa prépondérance dans l’amidon. En effet, sa seule présence suffit à générer les granules d’amidon, comme cela se produit dans les amidons cireux ou mutants qui sont dépourvus d’amylose (Oates, 1997).

Tableau 3

Propriétés de l'amylopectine des principaux amidons.

Amidon	Masse moléculaire (10^8 g.mol^{-1})	Degré de polymérisation (DP)	Longueur de chaîne (LC)	Références
Manioc	0,7[a]	1300[c]	21[d]	[a] (Yoo & Jane, 2002)
	3,1 - 4,2[b]		21[o]	[b] (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012)
			28[m]	[c] (Würzburg, 1986)
Pomme de terre	1,7[a]	9800[l]	23[o]	[d] (Susuki *et al.*, 1985)
	1,9[j]	11200[n]	24[d]	[e] (Hizukuri & Maehara, 1990)
	0,5[k]		29[m]	[f] (Takeda, Shitaozono, & Hizukuri, 1988)
Maïs	4,9[a]	8200[f]	22[o]	[g] (Takeda, Maruta, Hizukuri, & Juliano, 1989)
	0,1[j]	10200[h]	22[g]	[h] (Morrison & Karkalas, 1990)
	0,6[k]	15900[n]	24[m]	[i] (Seib, 1994)
Blé	3,1[a]	4800[e]	20-21[o]	[j] (Banks & Greenwood, 1975)
	0,01-0,1[i]		20[g]	[k] (Lelievre, Lewis, & Marsden, 1986)
			23[m]	[l] (BeMiller & Whistler, 2009)
Riz	26,8[a]	9000[g]	19-22[o]	[m] (Jane *et al.*, 1999)
		4700 - 12800[h]	20-21[g]	[n] (Takeda, Shibahara, & Hanashiro, 2003)
		8200 - 10900[n]	23[m]	[o] (Hizukuri, Abe, & Hanashiro, 2006)

Figure 4. La structure de l'amylopectine (D'après Weissenborn (1996)).

2.1.1.2. Organisation semi-cristalline

L'ultrastructure du granule d'amidon a été étudiée à l'aide de techniques d'hydrolyse acide ou enzymatique ménagée des granules d'amidon, suivie d'analyse par microscopie à haute résolution des résidus non hydrolysés.

L'observation par microscopie électronique à transmission (MET) de coupes ultrafines de granules ayant subi une hydrolyse acide ou enzymatique met en évidence une organisation de type « oignon » formée de couches concentriques alternativement amorphes et semi-cristallines. Ces couches correspondraient aux anneaux de croissance du granule, d'épaisseur variant de 120 à 400 nm (Yamaguchi, Kainuma, & French, 1979) (**Figure 5**).

Les couches semi-cristallines ont elles-mêmes une structure lamellaire (Kassenbeck, 1975, 1978; Yamaguchi *et al.*, 1979). Les lamelles sont tangentes aux anneaux de croissance et à la surface du granule. Ces lamelles auraient une longueur de plusieurs centaines d'angströms. Au fur et à mesure de l'hydrolyse, les lamelles sont de plus en plus apparentes et leur orientation devient irrégulière. Plus on se rapproche de la surface du granule, plus les anneaux de croissance sont étroits et l'orientation des lamelles régulière. L'organisation radiale des macromolécules et l'augmentation du désordre vers le hile du granule ont été confirmées pour les amidons de maïs par l'observation en microscopie par force atomique (MFA) de coupes de granules (Baker, Miles, & Helbert, 2001).

La façon dont les lamelles sont organisées dans le granule est encore un sujet de recherche. Gallant, Bouchet, & Baldwin (1997) proposent un modèle où les lamelles seraient organisées au sein de blocs sphériques (« blocklets ») ayant un diamètre variant de 20 à 500 nm selon l'origine botanique et leur localisation dans le granule d'amidon (**Figure 5**). La formation de ces blocs aurait lieu lorsque les anneaux de croissance se cassent sous l'effet du gonflement des canaux radiaux. Ce concept a été développé à partir d'observations par microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie électronique en transmission (MET) et microscopie à force atomique (MFA). Baker *et al.* (2001) montrent par MFA que les blocs auraient une taille de 400 - 500 nm dans l'amidon natif de maïs et de 10 - 30 nm pour des granules partiellement « lintnérisés » (traités à l'acide) (Lintner, 1886).

L'analyse enzymatique et la modélisation moléculaire montrent que les points de branchements ne sont pas distribués de manière aléatoire dans le granule.

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les granules ne sont pas dégradés uniquement au niveau des anneaux concentriques, mais également au niveau des canaux radiaux (Planchot, Colonna, Gallant, & Bouchet, 1995). Des canaux ont en effet été mis en évidence en observant par MEB la surface de granules de manioc subissant un phénomène de gélatinisation. Au fur et à mesure du gonflement du granule, la densité d'amylose augmente au niveau des pores de la surface du granule (Gallant *et al.*, 1997)**.**

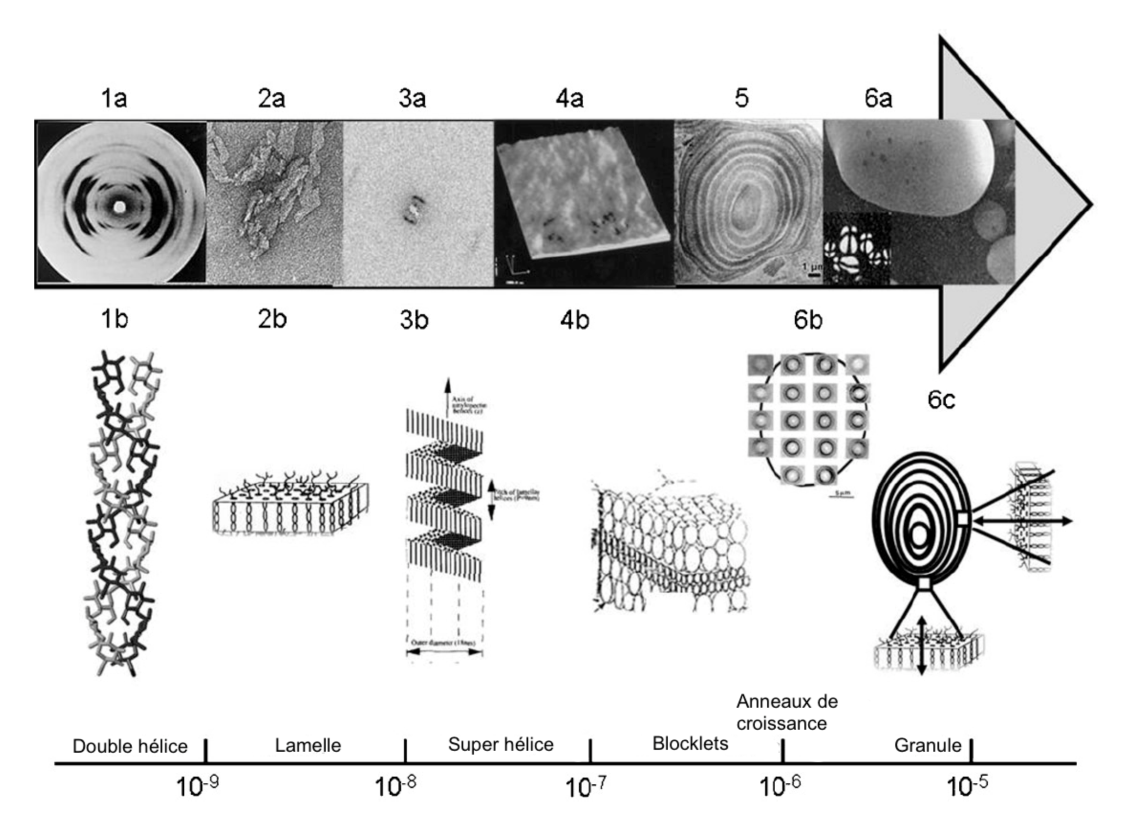


Figure 5. Architecture du granule et différents niveaux d'organisation structurale (d'après Pérez & Bertoft (2010)) :

1) Unité de Glucose / double-hélice.

1a) Image d'une fibre en diffraction de rayons X (DRX) montrant une structure en double-hélice (Imberty, Chanzy, Pérez, Bulèon, & Tran, 1988).

1b) Modèle de la structure de la double-hélice.

2) Lamelle cristalline.

2a) Image en MET d'amidon hydrolysé, montrant la forme des lamelles cristallines (Angellier-Coussy *et al.*, 2009).

2b) Modèle d'une lamelle cristalline composée d'environ 100 doubles-hélices.

3) Super-hélice.

3a) Images de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) et aux grands angles (WAXS) montrant la présence d'une structure en super-hélice (Waigh, Kato, *et al.*, 2000).

3b) Modèle de super hélice avec un pas de 9 nm et un diamètre de 18 nm.

4) « Blocklets ».

4a) Image par MFA de la surface du granule d'amidon (Gallant *et al.*, 1997). Les « bosses » visibles à la surface indiquent la présence de « blocklets ».

4b) Modèle de globule. Les « blocklets » sont plus petits dans les régions amorphes (région centrale) que dans les régions semi-cristallines

5) Anneaux de croissance.

Image par MET d'une section ultrafine d'un granule d'amidon hydrolysé, montrant les anneaux de croissance en couches alternatives de régions amorphes et semi-cristallines.

6) Granule.

6a) Granule d'amidon observé par MEB granule en lumière polarisée.

6b) Ensemble de schémas de DRX microfocalisés enregistrés avec un granule d'amidon montrant la distribution et l'orientation des domaines cristallins. Chaque schéma de diffraction correspond à une surface d'environ 3 μm^2 et des pas de 7 µm séparent les deux schémas (Buléon, Véronèse, & Putaux, 2007).

6c) Section de granule d'amidon montrant l'orientation radiale des domaines cristallins (lamelles).

L’analyse par diffraction des rayons X (DRX) montre que l’amidon est un polymère semi-cristallin (Katz, 1930). Cette structure semi-cristalline se compose de lamelles cristallines (structures ordonnées qui possèdent des « packages » étroits de chaînes de glucanes) et de lamelles amorphes (zones moins ordonnées qui incluent les points de ramification) (Oates, 1997).

2.1.1.2.1. La phase cristalline

Des travaux de recherche ont porté sur la caractérisation de la phase cristalline de l'amidon et la détermination de sa structure dans différentes conditions (Imberty *et al.*, 1988; Imberty & Pérez, 1988; Wu & Sarko, 1978a, 1978b). La difficulté à déterminer la structure des mailles cristallographiques provient de plusieurs facteurs parmi lesquels figurent l’imperfection et la grosseur des cristaux, ainsi que le degré d'hydratation. La teneur en eau joue en effet un rôle déterminant dans la conformation de l’amidon cristallin.

Il est admis et démontré que la majorité de la phase cristalline est constituée d'amylopectine tandis que les points de ramification et l’amylose sont les principaux composants de la zone amorphe (Jane, 2006; Oates, 1997; Zobel, 1988a, 1988b)**.** L’origine de la cristallinité est due à l’entrelacement des chaînes extérieures de l’amylopectine sous forme de double-hélices, elles-mêmes liées entre elles par des liaisons hydrogène, formant des « clusters » de doubles-hélices alignées parallèlement entre elles (Tester, Karkalas, & Qi, 2004) (**Figure 5**). L’amylopectine soutiendrait donc les domaines cristallins dans le granule d'amidon (Buléon *et al.*, 1998; Pérez & Bertoft, 2010).

Dans l’amidon gélatinisé et rétrogradé (i.e. recristallisé), en plus du degré d'hydratation, l'origine botanique et le traitement technologique subi par le produit (modifications chimiques, histoire thermique, etc.) influencent considérablement la structure finale des cristaux (Zobel, Young, & Rocca., 1998).

Par ailleurs, la teneur en amylose montre aussi un effet sur la cristallinité des amidons (Tester, Debon, & Sommerville, 2000). Les amidons ayant une teneur en amylose élevée présentent une organisation cristalline très altérée et il n’existe pas d’amidon natif contenant uniquement de l’amylose (Buléon *et al.*, 1998).

Les amidons natifs peuvent être classés en trois groupes selon leur type de diagramme de diffraction (Mestres, 1996) : A, B et C (**Figure 6**).

i) Le type A présente les pics les plus élevés en intensité de diffraction (2 θ) à 15, 17, 18 et 23°.
ii) Le type B possède les pics les plus élevés (2 θ) à 5,6; 15; 17; 18 et 23°.
iii) Le type C est associé à un mélange entre les deux modèles A et B.

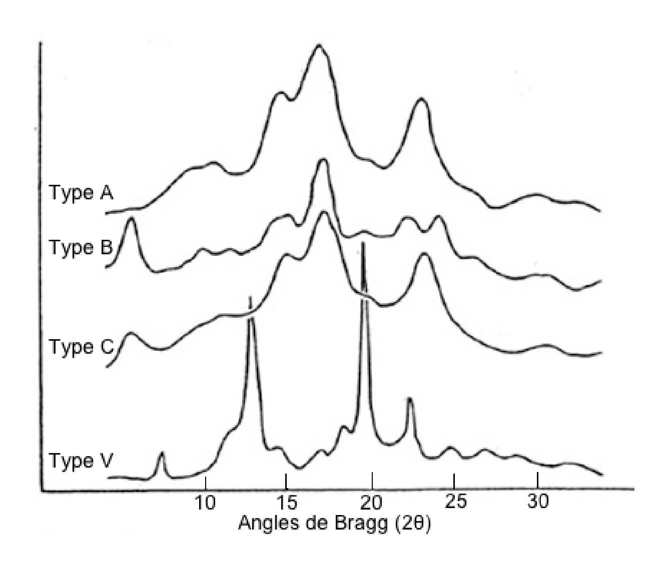


Figure 6. Diagramme de diffraction des rayons X des types A, B, C et V obtenus à partir de poudres semi-cristallines (d'après Zobel (1988)).

Le type A est caractéristique des amidons de céréales pauvres en amylose (<25%), c'est le cas de l'amidon de blé et de maïs cireux. Le type B caractérise des amidons de tubercules et de céréales riches en amylose (>65%). Enfin, le type C est caractéristique des amidons de légumineuses, racines et certains fruits, présentant des teneurs intermédiaires en amylose (entre 25% et 65%) (Tester *et al.*, 2004).

Les amidons de céréales qui contiennent des lipides peuvent présenter un type cristallin différent (type V) caractéristique des complexes amylose-lipides (Guilbot & Mercier, 1985; Rappenecker & Zugenmaier, 1981). Le type V est observé lors de la formation de complexes entre l'amylose et une molécule complexante (iode, alcools, cyclohexane, acides gras) (Rappenecker & Zugenmaier, 1981).

La structure élémentaire constituant les maillons cristallographiques est formée de « clusters » de doubles-hélices d'amylopectine (Wu & Sarko, 1978a, 1978b) à 6 unités de glucose par tour avec un pas égal à 2,1 nm (Imberty *et al.*, 1988; Imberty & Pérez, 1988). Les forces agissant sur le maintien de cette structure sont du type Van der Waals et liaison hydrogène dans une proportion de 40% et de 60% respectivement. Ces doubles hélices seraient disposées de façon antiparallèle : dans une maille cristallographique, une des hélices est disposée en conformation « up » et l'autre adjacente à cette dernière est placée en conformation « down ». Cependant, certaines études menées par French (1984) tendent à infirmer cette supposition prétendant que cet antiparallélisme des doubles-hélices engendrerait des problèmes importants au niveau de la synthèse biologique *in vivo* du produit.

La structure de la maille élémentaire est monoclinique dans le cas de la structure A (Wu & Sarko, 1978a; Zobel, 1988a). Entre chaque double-hélice, on observe la présence de 4 molécules d'eau (Sarko & Zugenmaier, 1980). La maille élémentaire de la structure de type B est une structure de type hexagonal (Wu & Sarko, 1978b). Le degré d'hydratation de la structure de type B est beaucoup plus important que celui de type A puisque le canal central créé par l'empilement des doubles-hélices peut contenir jusqu'à 36 molécules d'eau (Wu & Sarko, 1978a, 1978b) (**Figure 7**).

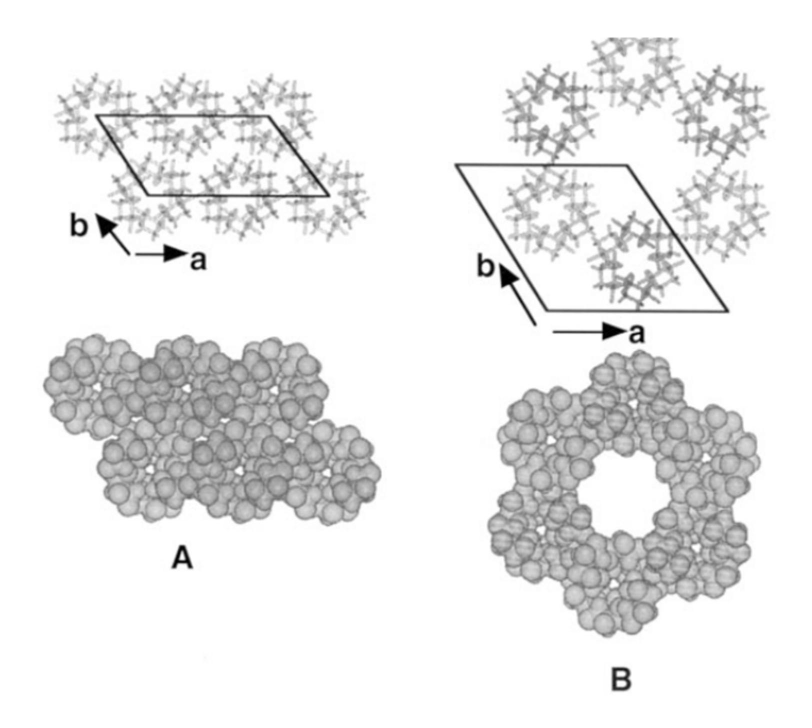


Figure 7. Arrangements cristallins des doubles-hélices dans les amyloses de type A et B (d'après Buléon *et al.* (1998)).

Étant donné la sensibilité de ces structures au degré d'hydratation et au positionnement des molécules d'eau dans la maille cristallographique, on définit la structure cristalline de type C comme étant une structure intermédiaire entre A et B.

L'allure du spectre de diffraction des rayons X de l'amidon dépend de la teneur en eau des granules au cours de la mesure. Plus l'amidon est hydraté, plus les raies du spectre s'affinent jusqu'à une certaine limite. L'eau fait donc partie intégrante de l'organisation cristalline de l'amidon. L'inexistence d'un témoin à 100% de cristallinité et l'effet de la teneur en eau rendent difficile la quantification absolue de la cristallinité. Cette teneur peut varier de 15% à 45% en fonction des espèces végétales, de l'hydratation de l'amidon et de la méthode utilisée pour sa détermination (**Tableau 4**) (Buléon *et al.*, 1998).

Tableau 4

Cristallinité relative de différents amidons déterminée par hydrolyse acide, diffraction aux rayons X (DRX) et résonance magnétique nucléaire ($RMN^{13}C$).

Amidon	Hydrolyse acide [a]	DRX [b,c]	$RMN^{13}C$ [b,c]
Type A			
Maïs normal	18 – 27	38 – 43	42 – 43
Maïs cireux	20 – 28	38 – 48	48 – 53
Amylomaïs	18	25	38
Blé	20 – 27	36 – 39	39
Riz	–	38 – 39	49
Type B			
Pomme de terre	18 – 24	25 – 40	40 – 50
Manioc	24	38	44

[a] Robin (1976)
[b] Gidley (1985)
[c] Cooke & Gidley (1992)

2.1.1.2.1. La phase amorphe

Il existe peu de travaux sur les caractéristiques de la phase intercristalline amorphe en dépit de son importance sur les propriétés physiques et réactionnelles de l'amidon. En effet, la délimitation entre cette phase et la phase cristalline n'est pas clairement définie et les chaînes d'amidon, particulièrement celles d'amylopectine, peuvent changer d'une phase à l'autre au cours du temps. On peut dire que près de 70% de l'amidon présent dans un granule possède un caractère amorphe. La proportion varie selon l'espèce végétale dont est issu l'amidon (Blanshard, 1987).

2.1.1.3. Structure supramoléculaire de l'amidon

La structure supramoléculaire de l'amidon correspond à la structure du granule d'amidon.

L'aspect physique et la grosseur des granules d'amidon natif varient d'une espèce végétale à l'autre. Ces granules peuvent se présenter sous forme d'ellipsoïdes (pommes de terre), polygones (maïs), sphères (blé) ou hémisphères tronqués (manioc) et leur grosseur peut varier de 2 µm à 175 µm (French, 1984; Lineback & Inglett, 1982) (cf. **Tableau 5**).

L'amidon est biosynthétisé pour donner forme à des granules qui présentent, en microscopie à lumière polarisée, une croix noire dite « croix de Malte ». Ce phénomène de biréfringence positive est dû à l'organisation semi-cristalline des granules : l'orientation moyenne des chaînes de polymère est radiale (Gallant, Bouchet, Buléon, & Pérez, 1992).

En présence d'eau et de chaleur (température supérieure à 50°C), le granule d'amidon perd son agencement semi-cristallin, du fait de la pénétration d'eau dans le granule

et de la fonte des cristallites d'amylopectine. Ce phénomène, nommé gélatinisation, se produit à différentes températures pour différents types d'amidons (Thomas & Atwell, 1988).

Tableau 5

Caractéristiques des granules d'amidon de différentes origines botaniques [a].

Amidon	Type	Forme	Taille (µm)
Orge	Céréale	Lenticulaire (type A)	15 − 25
		Sphérique (type B)	2 − 5
Maïs (cireux et normal)	Céréale	Sphérique/polyédrique	2 – 30
Amylomaïs	Céréale	Irrégulière	2 – 30
Mil	Céréale	Polyédrique	4 – 12
Avoine	Céréale	Polyédrique	3 − 10 (seul)
			80 (composé)
Pois	Légume	Réniforme (seul)	5 – 10
Pomme de terre	Tubercule	Lenticulaire	5 – 100
Riz	Céréale	Polyédrique	3 − 8 (seul)
			150 (composé)
Seigle	Céréale	Lenticulaire (type A)	10 – 40
		Sphérique (type B)	5 – 10
Sorgho	Céréale	Sphérique	5 – 20
Manioc	Racine	Sphérique/lenticulaire	5 – 45
Triticale	Céréale	Sphérique	1 – 30
Sagou	Céréale	Ovale	20 – 40
Blé	Céréale	Lenticulaire (type A)	15 – 35
			2 – 10

[a] D'après Tester, Karkalas, & Qi (2004)

2.1.2. Comportement du granule d'amidon en milieux aqueux

Les granules d'amidons natifs sont insolubles dans l'eau à température ambiante. En présence d'un excès d'eau et à une température supérieure à 50 - 60°C, le granule d'amidon passe successivement par trois états : gonflement, gélatinisation et solubilisation. Au cours du refroidissement, un gel physique se forme, c'est la « rétrogradation » (Thomas & Atwell, 1988) (cf. **Figure 8**).

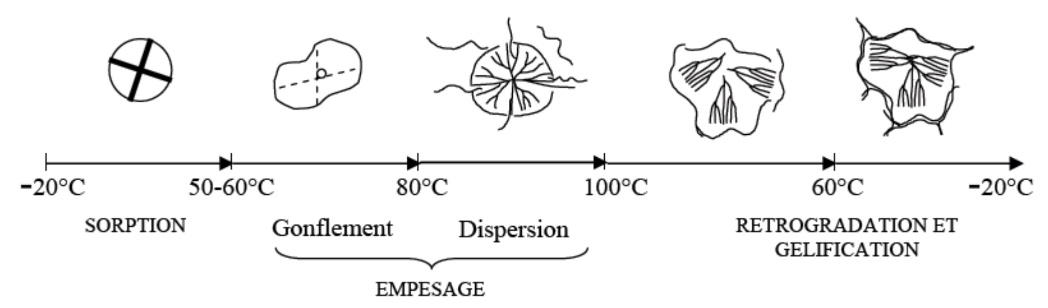


Figure 8. Différents états du granule d'amidon placé en excès d'eau en fonction de la température (Duprat *et al.*, 1980).

2.1.2.1. La gélatinisation

La gélatinisation ou encore l'empesage se produit lors du chauffage de l'amidon en excès d'eau (proportion d'eau supérieure à 60 - 70%, base humide). Ce phénomène entraîne une transition d'ordre (structure semi-cristalline)-désordre (structure amorphe) irréversible (BeMiller & Whistler, 2009; Garcia, Colonna, Bouchet, & Gallant, 1997; Tester *et al.*, 2000). Cette phase de transition est associée à la diffusion des molécules d'eau à l'intérieur du granule, à l'absorption d'eau par les régions amorphes, au gonflement radial des granules d'amidon, entrainant la perte de biréfringence optique et la perte de l'ordre moléculaire (BeMiller & Whistler, 2009; Biliaderis & Zawistowsi, 1990; Hoover, 2001).

L'empois d'amidon correspond à une suspension des granules d'amidon gonflés et riches en amylopectine, également appelés « fantômes », entourés de chaînes d'amylose en suspension dans l'eau environnante.

Le point de gélatinisation initial et la plage de température sur laquelle la gélatinisation se produit dépendent de la concentration de l'amidon, des méthodes d'observation, du type de granule et des hétérogénéités au sein de la population des granules sous observation (Atwell, Hood, Lineback, Varriano-Marston, & Zobel, 1988). Nous soulignons la concentration de l'amidon et le type de granules (cf. **Tableau 6**) comme les facteurs les plus importants.

Sur la concentration de l'amidon, les énergies d'activation de la gélatinisation diminuent avec l'augmentation de la teneur en eau, pour se stabiliser à partir de 60% d'eau (Spigno & De Faveri 2004). A faibles teneurs en eau, les amidons gélatinisent à des températures beaucoup plus élevées (Biliaderis, Maurice, & Vose, 1980; Donovan, 1979). Zhong & Sun (2005) ont montré par analyse calorimétrique différentielle (ACD ou DSC), qu'aux teneurs en eau inférieures à 29,5%, l'endotherme de gélatinisation se déporte à des températures élevées et se dédouble. Ainsi, le deuxième pic de gélatinisation disparaît.

Le comportement de l'amidon du manioc lors de la gélatinisation a été analysé par plusieurs techniques (cf. **Tableau 7**), dont la rhéologie utilisant le RVA (Walker, Ross, Wrigley, & McMaster, 1998), l'ACD (Donovan, 1979), l'analyse thermomécanique (ATM) (LeMeste, Huang, Panama, Anderson, & Lentz, 1992), la diffraction aux rayons X (Zobel *et al.*, 1998), la spectroscopie FTIR (Jane, Xu, Radosavljevic, & Seib, 1992), la résonance de spin électronique, la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) (Jenkins, 1994), la platine chauffante de Kofler (Watson, 1964), les analyses enzymatiques (Lund & Lorenz, 1984). Les analyses utilisées pour notre étude seront détaillées dans la section 3.3. : Analyses des échantillons.

Tableau 6

Gélatinisation, empesage et propriétés d'empois des amidons d'origines botaniques différentes (Jane *et al.*, 1999). [d]

Amidon	Gélatinisation [a]			Rétrogradation [b]	Empesage et propriétés d'empois [c]			
	T_o (°C)	Plage (°C)	Enthalpie (ΔH, J/g)	(%)	Température d'empesage (°C)	Viscosité (RVU)		
						Viscosité maximale	Holding strength	Viscosité finale
Type A								
Maïs normal	64,1	10,8	12,3	47,6	82,0	152	95	169
Maïs cireux	64,2	10,4	15,4	47,0	69,5	205	84	100
Maïs cireux "du"	66,1	14,4	15,6	71,2	75,7	109	77	99
Riz normal	70,3	9,9	13,2	40,5	79,9	113	96	160
Riz cireux	56,9	13,4	15,4	5,0	64,1	205	84	100
Riz doux	58,6	12,8	13,4	4,3	64,6	219	100	128
Blé	57,1	9,1	10,7	33,7	88,6	104	75	154
Quenouille du mil	67,1	8,5	14,4	53,8	74,2	201	80	208
Haricot Mung	60,0	11,5	11,4	58,9	73,8	186	161	363
Taro chinois	67,3	12,5	15,0	32,0	73,1	171	88	161
Manioc	64,3	10,1	14,7	25,3	67,6	173	61	107
Type B								
Maïs cireux "ae"	71,5	25,7	22,0	61,6	83,2	162	150	190
Pomme de terre	58,2	9,5	15,8	43,4	63,5	702	165	231
Type C								
Racine de Lotus	60,6	10,5	13,5	43,2	67,4	307	84	138
Banane verte	68,6	7,5	17,2	47,7	74,0	250	194	272
Châtaigne d'eau	58,7	24,1	13,6	47,9	74,3	61	16	27

[a] Les paramètres de gélatinisation ont été obtenus par ACD. La plage correspond à la différence de température entre la température finale et la température initiale (T_o).

[b] Le % de rétrogradation est calculé par le rapport Δ*H* amidon rétrogradé / Δ*H* gélatinisation.

[c] Déterminé par un viscoanalyseur rapide, utilisant 8% (m/m, b.s.) d'amidon dans l'eau (28 g de la masse totale).

Tableau 7

Méthodes d'analyse de la gélatinisation de l'amidon.

Microscopie optique[a]
Microscopie électronique[b]
Transmission de la lumière[c]
Viscométrie[d]
Détermination de gonflement et solubilité[e]
Granulométrie par diffraction laser[f]
H-RMN[g]
^{13}C RMN en haute résolution[h]
^{13}C-PC/MAS-RMN[a]
FTIR[i]
ESR[j]
DSC[k]
ATD[k]
Analyses enzymatiques[l]

[a] (Biliaderis, 1982)
[b] (Valetudie, Guadeloupe, Colonna, Bouchet, & Gallant, 1995)
[c] (Hill & Dronzek, 1973)
[d] (Okechukwu & Anandha Rao, 1996)
[e] (Jaska, 1971)
[f] (Hennig, Lechert, & Goemann, 1976)
[g] (Mendes Da Silva, Ciacco, Barberis, Solano, & Rettori, 1996)
[h] (Slade & Levine, 1995)
[i] (Jane *et al.*, 1992)
[j] (Biliaderis *et al.*, 1980)
[k] (LeMeste *et al.*, 1992)
[l] (Lund & Lorenz, 1984)

Mécanismes de gélatinisation.

La gélatinisation a lieu à la frontière des zones amorphes enrichies en eau et des cristallites, par « arrachage » des chaînes de surface des cristallites suite à la rupture des liaisons hydrogènes (Donovan, 1979). Le phénomène de gélatinisation implique la fusion des phases cristallines, constituées par l’empilement ordonné des doubles hélices d’amylopectine structurées en lamelles (Cooke & Gidley, 1992; Jane *et al.*, 1999; Tester & Morrison, 1992; Waigh, Gidley, Komanshek, & Donald, 2000; Zobel *et al.*, 1998) et une solubilisation de l’amylose préalablement dispersée dans les phases amorphes des granules.

2.1.2.2. La rétrogradation

La rétrogradation est un des facteurs les plus importants dans les produits panifiés et de boulangerie notamment pour le contrôle du rassissement (BeMiller & Whistler, 2009).

La rétrogradation de l'amylose, plus rapide que celle de l'amylopectine, a lieu dans les minutes qui suivent la fin de cuisson et renforcent la texture du produit. La rétrogradation de l'amylopectine se produit pendant plusieurs heures ou jours après la fin de cuisson (Ottenhof & Farhat, 2004).

La rétrogradation de l'amidon est un processus qui se produit lorsque les chaînes d'amidon commencent à se réassocier en une structure ordonnée. Cette réorganisation se caractérise en premier lieu par une transition du type pelote statistique en double hélice au niveau des segments de chaînes polymères et en second lieu par une cristallisation par empilement des chaînes (Atwell *et al.*, 1988). Ce mécanisme dépend de nombreuses variables dont notamment la structure de l'amylose et de l'amylopectine, le rapport amylose/amylopectine, la concentration en amidon, son origine botanique et la concentration en d'autres constituants du milieu (Jacobson, Obanni, & Bemiller, 1997).

Les méthodes les plus courantes pour analyser cette propriété sont : l'ATD et l'ACD, la diffraction aux rayons X, les essais mécaniques à petite et grande déformation, et plusieurs méthodes spectroscopiques, notamment par RMN, spectroscopie FTIR et RAMAN (BeMiller & Whistler, 2009). A partir de l'ACD, la rétrogradation de l'amylopectine peut être caractérisée par un pic endothermique correspondant à la fusion des cristallites (en excès d'eau) détectée à une température d'environ 60°C (Tran, Piyachomkwan, & Sriroth, 2007). Par ailleurs, la rétrogradation de l'amylose peut être estimée par le paramètre setback lors d'une analyse par viscoanalyseur rapide (RVA).

L'amidon de manioc ayant une des teneurs les plus faibles en amylose présente une rétrogradation des plus faibles par rapport aux autres amidons (Jane *et al.*, 1999) (cf. **Tableau 6**). Une corrélation entre la teneur en amylose et le % de rétrogradation (de l'amylopectine) a été démontrée dans l'amidon de riz (Yu, Ma, & Sun, 2009). Ce mécanisme serait dominé par l'amylose (Yu *et al.*, 2009). De plus, les amidons autres que celui du manioc ont une masse moléculaire élevée (BeMiller & Whistler, 2009).

2.2. Les amidons modifiés.

Le terme « amidon natif de manioc » s'applique au produit extrait des racines de manioc. L'amidon natif correspond à un produit qui n'a subi ni hydrolyse par action de microorganismes, ni traitements thermique, chimique ou enzymatique (Sriroth, Piyachomkwan, Wanlapatit, & Oates, 2000).

Selon la norme ISO N°1227-1979, l'amidon modifié est un amidon dont une ou plusieurs propriétés physiques ou chimiques sont modifiées (Tara, 2005), afin d'améliorer leurs propriétés, de limiter les problèmes occasionnés au cours de procédés industriels, ou d'ajouter de nouvelles caractéristiques (Bemiller, 1997; Bertolini, 2010; Moorthy, 2004). Le but est d'améliorer la fonctionnalité et la valeur ajoutée de l'amidon. Les amidons modifiés, au contraire des amidons natifs (Jobling, 2004), présentent des propriétés fonctionnelles permettant de répondre à des besoins technologiques et nutritionnels spécifiques (BeMiller & Whistler, 2009; Bemiller, 1997; Buléon *et al.*, 1990; Moorthy, 2004).

La modification par fermentation et irradiation UV de l'amidon du manioc, connue sous le nom d'amidon aigre est utilisée pour la fabrication du pain traditionnel en Amérique du Sud ainsi que des produits de type snack et des produits panifiés sans gluten (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Demiate *et al.*, 2000).

Les modifications de l'amidon de manioc par fermentation et irradiation UV ainsi que leurs propriétés seront développées par la suite (section 2.2.1.).

2.2.1. Modification de l'amidon de manioc par fermentation et irradiation UV.

L'amidon de manioc qui est modifié enzymatiquement par fermentation naturelle et chimiquement par irradiation UV acquiert des propriétés d'expansion intéressantes, devenant ainsi panifiable (Dufour *et al.*, 1995; Marcon *et al.*, 2007; Mestres & Rouau, 1997). Une autre caractéristique de ce type d'amidon est l'absence du gluten (Bertolini, 2000; Marcon *et al.*, 2009). Cet amidon modifié par fermentation et irradiation UV est connu sous le nom d'« amidon aigre ». Au Brésil et en Colombie, les principaux pays producteurs d'amidon aigre (Westby & Cereda, 1994), il est connu sous le nom de « *polvillo azedo* » et « *almidón agrio* » (Lacerda *et al.*, 2005; Mestres & Rouau, 1997). L'Argentine, le Paraguay et l'Equateur (Caballero-Vera, Villafuerte, & Poats, 1997) en produisent aussi mais de manière irrégulière et limitée (Dufour, Lafond, Lambert, & Blary, 1993). Cet amidon est essentiellement utilisé pour la fabrication de produits panifiés (Cárdenas & de Buckle, 1980; Moorthy, 2004).

Les principales étapes d'obtention de l'amidon aigre au Brésil et en Colombie sont : l'extraction de l'amidon, la fermentation naturelle pendant environ 30 jours et finalement le séchage au soleil pendant 12 heures (Cárdenas & de Buckle, 1980; Cereda, 1973; Westby & Cereda, 1994; Zakhia *et al.*, 1996) (Les étapes de production de l'amidon aigre sont décrites

plus en détail dans le chapitre matériel et méthodes). Dû à l'obtention empirique, le pouvoir de panification de l'amidon aigre est d'une qualité très irrégulière sur le marché (Dufour *et al.*, 1995) et souvent imprévisible (Dufour *et al.*, 1996).

Le mécanisme de gonflement de l'amidon de manioc aigre serait le suivant : la force motrice devrait être l'évaporation d'eau et l'expansion des cellules devrait être gouvernée principalement par la viscosité de la pâte/croûte (Bertolini, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001).

Des travaux importants ont été effectués pour mieux comprendre la capacité de panification de l'amidon aigre (Dufour, Larsonneur, Alarcon Morante, Brabet & Chuzel, 1996; Mestres & Rouau, 1997; Mestres, Rouau, Zakhia & Brabet, 1996). La plupart des études concernent les effets de la fermentation et du séchage au soleil sur les propriétés physico-chimiques et le comportement en cuisson de l'amidon aigre tels que le pH, la solubilité, le volume spécifique, le degré de polymérisation (Marcon *et al.*, 2009); le degré d'oxydation (Guerra Dias, Zavareze, Elias, Helbig, da Silva & Ciacco, 2011); et les propriétés thermomécaniques de la pâte d'amidon (Bertolini, Mestres, Lourdin, Valle & Colonna, *et al.*, 2001a).

Ces études suggèrent qu'un mécanisme de dégradation de l'amidon au cours de la fermentation et du séchage au soleil joue un rôle clé dans les propriétés de panification. Cependant, la nature de ces changements n'est pas complètement élucidée (Dufour, Brabet, Zakhia & Chuzel, 1995). Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer le lien entre la dégradation de l'amidon et la capacité de panification :

D'une part, au niveau moléculaire, la formation de radicaux libres entraîne l'oxydation et la dépolymérisation de l'amidon (Bertolini, Mestres & Colonna, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, Buléon, Lerner & Colonna, 2001b; Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda & Wosiacki, 2000; Guerra Dias *et al.*, 2011; Vatanasuchart, Naivikul, Charoenrein & Sriroth, 2005).

D'autre part, au niveau supramoléculaire, la structure des granules d'amidon est endommagée, modifiant ainsi le comportement de gélatinisation (Camargo, Colonna, Buleon & Richard-Molard, 1988; Gomes, Mendes da Silva & Ricardo, 2005; Onitilo, Sanni, Oyewole & Maziya-Dixon, 2007).

2.2.1.1. Influence de la fermentation naturelle et du séchage au soleil sur la structure de l'amidon de manioc.

2.2.1.1.1. Structure moléculaire.

Plusieurs travaux confirment une dégradation moléculaire de l'amidon de manioc après fermentation et/ou séchage solaire. La diminution de la viscosité intrinsèque et

l'augmentation de la teneur en groupements carbonyle et/ou carboxyle sont souvent interprétées comme des conséquences de la fermentation :

Un effet synergique des traitements fermentation-irradiation UV est mis en évidence par une réduction plus importante de la viscosité intrinsèque, comparée à celle des traitements non combinés (Bertolini, Mestres, Colonna, & Raffi, 2001; Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997) (**Tableau 8**).

L'augmentation des groupements carboxyle de l'amidon de manioc après les traitements de fermentation seule (Putri, Haryadi, Marseno, & Cahyanto, 2012) et fermentation et séchage solaire (da Silva *et al.*, 2006) est constatée. Guerra-Dias *et al.* (2011) constatent une augmentation de la teneur en groupements carbonyle et carboxyle des amidons de manioc fermentés lors du traitement de séchage solaire (**Tableau 8**).

2.2.1.1.2. Structure semi-cristalline.

Des études de diffraction des rayon X montrent que les traitements de fermentation et/ou de séchage solaire ne modifient pas la structure cristalline de l'amidon de manioc (Camargo *et al.*, 1988; Mestres & Rouau, 1997; Plata-Oviedo & Camargo, 1998). Ces observations sont cohérentes avec celles de Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.* (2001) concernant le traitement par acide lactique et irradiation UV. Cependant, une récente étude de Putri *et al.* (2012) a montré une réduction de la cristallinité relative de 6,4 à 8,6% après le traitement de fermentation.

Des travaux sur les propriétés thermiques de l'amidon du manioc soumis aux traitements de fermentation et/ou séchage solaire ne montrent pas de différences significatives par rapport à l'amidon natif (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998).

2.2.1.1.3. Structure supramoléculaire.

Le granule d'amidon natif traité par fermentation et/ou irradiation UV entraîne une dégradation superficielle et/ou un endommagement significatif de la structure interne.

Le granule d'amidon de manioc lors du traitement par fermentation naturelle subit une légère dégradation (Brabet, 1994; Mestres & Rouau, 1997). Ces érosions superficielles sont visibles au microscope électronique à balayage pour moins de 1% des granules ayant subi un traitement de fermentation (Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998). D'autres auteurs (Cárdenas & de Buckle, 1980; Onitilo *et al.*, 2007) ont observé au microscope l'apparition de « fentes » et de « piqûres » dans les amidons aigres (fermentés) par rapport aux amidons « doux ». Cárdenas & De Buckle (1980) signalent des modifications de morphologie d'environ 10% des granules d'amidon aigre par rapport à l'amidon doux.

Tableau 8

Viscosité intrinsèque et teneur en groupements carbonyle et carboxyle des amidons de manioc natif, fermenté (ou acidifié) et/ou séché au soleil (irradié aux UV).

Traitement	Viscosité intrinsèque ($mL.g^{-1}$)	CO (%)	COOH (%)
Natif	177[a]; 183-169[b]; 169[c]; 177-196[d]; 169[e]	0,18[f]	0,16[f]; 0,16-0,30[g]
Fermenté (ou acidifié)	(139)[a]; (154-147)[b]; (147)[c]; 166[d]; 100[e]	0,18-0,20[f]; 0,04[h]	0,24-0,32[f]; 0,29-0,30[g]; 0,04[h]
Séchage solaire (ou irradiation UV)	(126)[a]; (173-154)[b]; (113)[c]	-	-
Fermenté (ou acidifié) et séché au soleil (ou irradié aux UV)	(97)[a]; 85[b]; (99)[c]; 93[d]	0,07[h]	0,06[h]

[a] (Bertolini, Mestres, Colonna, *et al.*, 2001)
[b] (Bertolini *et al.*, 2000)
[c] (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001)
[d] (Marcon *et al.*, 2009)
[e] (Mestres & Rouau, 1997)
[f] (Putri *et al.*, 2012)
[g] (da Silva *et al.*, 2006)
[h] (Guerra-Dias *et al.*, 2011)

Par ailleurs, des études montrent que les amidons natifs voient leur viscosité RVA diminuer significativement au cours des traitements de fermentation et d'irradiation UV (Camargo *et al.*, 1988; Cárdenas & de Buckle, 1980; Dufour *et al.*, 1996; Mestres & Rouau, 1997). Ainsi la dégradation de la structure des granules entrainerait une modification du comportement de gélatinisation mis en évidence par RVA. En effet, les amidons natifs soumis à la fermentation seule (Franco *et al.*, 2010) et la fermentation et irradiation UV (Putri *et al.*, 2012) présentent une diminution du paramètre RVA breakdown (peak viscosity – holding strength).

Des tentatives ont été effectuées pour réduire le temps de fermentation à l'aide de cultures microbiennes plus efficaces. L'utilisation de l'inoculum issu de la fermentation améliore également la capacité de panification de l'amidon de manioc (Moorthy, 2004).

Différents auteurs ont essayé de comprendre quel serait le type de modification responsable des propriétés de panification de l'amidon aigre de manioc ; certains ont attribué cette propriété à l'enzyme α-amylase et aux légères modifications du granule de l'amidon produites pour les acides organiques de la fermentation naturelle ainsi qu'à la présence de quelques exopolysaccharides bactériens produits au cours de la fermentation (Lacerda *et al.*, 2005; Plata-Oviedo & Camargo, 1998).

D'autres ont émis l'hypothèse que la longueur d'onde UV ainsi que la fermentation lactique seraient essentielles pour acquérir la capacité d'expansion de l'amidon (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Vatanasuchart *et al.*, 2005).

Il est donc établi que les propriétés fonctionnelles de l'amidon de manioc sont modifiées par fermentation et exposition à la lumière : le potentiel de panification est augmenté tandis que la viscosité de la dispersion d'amidon à chaud est diminuée (viscosité RVA). Cependant, la base physico-chimique de cette modification n'est pas encore clairement établie (Mestres & Rouau, 1997).

La diminution de la viscosité de l'empois d'amidon aigre ainsi que l'augmentation du pH pourraient être les conséquences d'une modification chimique pendant le traitement. Les modifications oxydatives (comme la dépolymérisation) des molécules d'amidon de manioc liées à l'action conjointe de la fermentation et du séchage au soleil peuvent être supposées (Mestres & Rouau, 1997).

2.2.2. Les propriétés de l'amidon aigre.

La principale propriété de l'amidon aigre de manioc est sa capacité d'expansion plus élevée que l'amidon natif (Dufour *et al.*, 1995; Marcon *et al.*, 2007; Mestres & Rouau, 1997), ce qui le rend intéressant pour des produits panifiés. La panification de l'amidon aigre est distincte de la panification du blé, car (1) l'amidon aigre ne contient pas de gluten et la formation de la mie repose sur l'expansion de la matrice d'amidon seule ; et (2) la pâte à

pain d'amidon aigre gonfle par la formation et l'expansion de bulles de vapeur d'eau au cours de la cuisson au four, et non par la formation de bulles de CO_2 par des levures. Les mécanismes de la panification de l'amidon aigre sont développés en section 2.3.3.

L'amidon aigre de manioc est utilisé pour la préparation de produits panifiés traditionnels en Amérique latine, notamment au Brésil et en Colombie :

Au Brésil, le *polvilho azedo* est utilisé dans la production de produits panifiés comme par exemple des biscuits expansés salés et roulés au fromage (Aplevicz & Demiate, 2007; Camargo *et al.*, 1988; Cárdenas & de Buckle, 1980; Demiate *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2007; Nakamura & Park, 1975; Plata-Oviedo & Camargo, 1998; Westby & Cereda, 1994). Ces produits sont traditionnellement utilisés pour leurs qualités sensorielles et leur goût caractéristique. D'après Cereda (1983), deux produits classiques sont obtenus à partir du *polvilho azedo* : le « *pão de queijo* » et le « *biscoito de polvilho* ». Le *pão de queijo* est un produit caractérisé par une mie élastique, une structure alvéolaire et des arômes caractéristiques de la fermentation lactique. Ce produit est élaboré à partir de la cuisson d'une pâte d'amidon aigre, de fécule de manioc, de fromage, d'œufs, de sel et d'eau. Le *biscoito de polvilho* est un biscuit croustillant, de structure alvéolaire poreuse et rigide. Ce produit résulte de la cuisson d'une pâte constituée d'amidon aigre, d'eau et de sel.

En Colombie, deux produits sont élaborés à partir de l'*almidon agrio* : le « *pandebono* » et le « *pandeyuca* » (Alarcón & Dufour, 1998; Brabet, Chuzel, Dufour, & Raimbault, 1996; Brabet, 1994; Dufour *et al.*, 1996). Ces deux produits sont constitués de deux ingrédients de base : l'amidon aigre de manioc et le fromage. Le fromage de type « *costeño* » (fromage frais, dur, peu fermenté et très salé) est généralement utilisé pour cette préparation. En plus, pour améliorer les caractéristiques sensorielles du *pandebono* et du *pandeyuca*, d'autres ingrédients (lait, œufs, sucre, sel, etc.) sont rajoutés en quantités variables selon le produit préparé et la recette utilisée (Brabet, 1994). Le *pandebono* et le *pandeyuca* présentent une apparence gonflée et une structure alvéolaire de la mie (Cárdenas & de Buckle, 1980; Mestres & Rouau, 1997).

2.3. La panification

Le pain est l'un des aliments de base le plus consommé par l'humanité (Cauvain & Young, 2007). Le pain est un produit équilibré, source d'énergie, de protéines, de vitamines (en particulier les vitamines du groupe B), de minéraux et de fibres alimentaires (W. Zhou & Therdthai, 2006).

Le pain de consommation est défini comme le produit obtenu par la cuisson d'une pâte composée de farines panifiables, de levure ou de levain, d'eau et de sel (Landraf, 2002).

La formulation classique du pain de blé est la suivante : 100 parties de farine de blé, 60 parties d'eau, 2 parties de sel et 2 parties de levure biologique (Godon, Popineau, & Ducarouge, 1981). Toutefois, d'autres ingrédients et additifs sont habituellement inclus dans une formulation de pain typique pour améliorer leur qualité (Hoseney & Seib, 1978). Ainsi, on peut aussi trouver du sucre, du lait en poudre écrémé (ou un substitut), du malt, des émulsifiants, des inhibiteurs de moisissures (par exemple, le propionate de sodium), des enzymes (amylases) et des oxydants (Lai & Lin, 2006). Ils stabilisent et améliorent la texture, le volume, la durée de vie de la pâte à pain et du pain après cuisson. Les émulsifiants (par exemple les mono et di glycérides) se complexent avec l'amylose ce qui laisse moins d'amylose libre après la cuisson, ainsi moins d'amylose est disponible pour former un gel rigidifiant la mie dans la pâte. Les amylases, en hydrolysant légèrement l'amidon retardent le raffermissement de la mie de pain dû à la rétrogradation, et prolongent la durée de vie des produits panifiés (Stampfli & Nersten, 1995; Whitehurst, 2008). Les principales fonctions des plus importants composants utilisés dans le pain sont résumées dans le **Tableau 9.**

La panification est affectée par plusieurs caractéristiques de l'amidon, notamment par la gélatinisation et la rétrogradation, qui sont considérées très importantes pour la qualité du pain, en particulier la texture (Miyazaki, Van Hung, Maeda, & Morita, 2006).

2.3.1. Le procédé de panification.

Un procédé de fabrication classique du pain de blé se compose de quatre étapes : le pétrissage, le pointage, l'apprêt et la cuisson (Landraf, 2002).

2.3.1.1. Le pétrissage

Le pétrissage consiste à appliquer une force mécanique afin d'assurer l'homogénéisation des différents ingrédients (Peighambardoust, Fallah, Hamer, & van der Goot, 2010).

Le pétrissage se compose de deux phases : le frasage et le pétrissage en tant que tel. Ces deux phases sont effectuées dans le pétrin, l'une à la suite de l'autre.

Tableau 9. Fonctions des principaux composants utilisés dans le pain (Doerry, 1995)

Composant	Fonction	Description
Farine	Structure	1. La protéine (la gliadine et la glutenine) + l'eau forment un matériel visco-élastique (le gluten) pour retenir le gaz qui est formé par la fermentation du sucre et contribuent à la formation de la structure de la pâte à pain.
		2. L'amidon + l'eau + la chaleur forment une pâte visqueuse qui fixe le gel après cuisson. Lors du stockage, l'amidon cristallise (rétrograde) et contribue au raffermissement (majeure partie du rancissement) du pain.
		3. La teneur en protéines de la farine du pain est 11-13% (sur une teneur en humidité de 14%).
Eau	Hydratation	1. L'eau hydrate la protéine pour former le gluten.
		2. L'eau hydrate les parois des cellules des polysaccharides non amylacés de la farine (pentosanes) et endommage les granules d'amidon.
		3. L'eau sert de solvant, d'agent de dispersion et de moyen pour la production des réactions chimiques et biochimiques.
		4. L'eau aide à la mobilité de la pâte.
Levure	Levage	1. Les levures produisent du CO_2 et de l'éthanol par fermentation des sucres fermentables.
		2. Les levures conditionnent biochimiquement la pâte.
		3. Les levures forment les précurseurs du goût.
		4. Le taux de fermentation est contrôlé par la température, l'apport de nutriments, le niveau d'eau, le pH, la concentration en sucre, le sel, et le niveau et le type de levure.
Sel	Exhausteur du goût	1. Le sel aide à contrôler la fermentation.
		2. Le sel durcit la pâte en interaction avec le gluten.
		3. Le sel étend le développement de la pâte (l'addition tardive du sel dans le mélange de la pâte diminue le temps de mélange en 10-20%).
Nourriture minérale des levures	Contrôle de la fermentation	1. La nourriture minérale des levures est un conditionneur de l'eau (p.e. sels de calcium).
		2. La nourriture minérale des levures est un conditionneur des levures (p.e. sels d'ammonium).
		3. La nourriture minérale des levures est un conditionneur de la pâte à pain (p.e. des agents oxydants).
Sucre	Source énergétique pour les levures	1. Le sucre contribue à la fermentation des carbohydrates.
		2. Le sucre est impliqué dans la saveur (les sucres résiduels) et dans la fermentation des sous-produits. Le sucre est un composant de type Maillard au cours de la cuisson.
		3. Le sucre est présent dans la couleur de la croûte qui résulte de la caramélisation (sucre + chaleur) et du brunissement non enzymatique (le sucre réducteur + un groupe amine de protéines, les acides aminés, etc.).
Matière grasse	Lubrification	1. La matière grasse facilite l'expansion des bulles de gaz de la pâte.
		2. La matière grasse lubrifie les lames de tranches au cours du découpage du pain.
		3. La matière grasse prolonge la durée de vie des produits panifiés.
		4. La matière grasse attendrit la croûte du pain.
Produits laitiers	Nutrition et amélioration de la couleur de la croûte	1. Les produits laitiers fournissent de la protéine (haute en lysine) et du calcium.
		2. Les produits laitiers améliorent la saveur des produits panifiés.
		3. Les produits laitiers sont impliqués dans la couleur de la croûte (réaction de brunissement et caramélisation).
		4. Les produits laitiers ont un effet tampon dans la pâte et leurs liquides fermentés.

Le frasage s'effectue à vitesse lente afin de mélanger les ingrédients et d'hydrater la farine. Ce procédé incorpore l'eau au gluten de l'amidon de la farine. Les particules de gluten gonflent et forment un réseau semblable à un échafaudage.

Le pétrissage en tant que tel se réalise à vitesse plus rapide (environ deux fois plus vite que celle du frasage). Ce traitement consiste à développer le réseau glutineux.

2.3.1.2. Le pointage

Le pointage est la première étape de fermentation de la pâte en masse. Ce procédé est décomposé en quatre phases : le pointage en tant que tel, la division, le boulage et la détente (Landraf, 2002).

Le premier objectif du pointage est de donner de la force à la pâte, en développant le réseau du gluten, qui devient alors plus ferme, plus élastique et plus extensible. Le tissu glutineux ainsi formé peut retenir le dioxyde de carbone. Le deuxième objectif du pointage est de favoriser le développement des arômes du pain.

La division est le procédé dans lequel la masse de pâte initiale est fractionnée en pâtons de masse déterminée en fonction du produit fini désiré (baguette, bâtard, pain...).

Le boulage est l'opération après la division où les pâtons sont remis en forme de petites boules de pâte.

La détente est la « mise au repos » des pâtons.

2.3.1.3. L'apprêt

L'apprêt est la deuxième étape de fermentation appliquée aux pâtons boulés. Ce procédé est décomposé en deux phases : le façonnage et l'apprêt (Landraf, 2002). Le façonnage consiste à donner sa forme finale au pain. L'apprêt consiste à laisser fermenter et gonfler les pâtons façonnés, de préférence à température et humidité relative contrôlées.

2.3.1.4. La cuisson

La cuisson du pain est réalisée à environ 250°C. Le four doit être préchauffé car une certaine quantité de chaleur est perdue à l'introduction des pâtons. La cuisson dure typiquement entre 40 et 60 minutes, selon la taille des pains à cuire.

2.3.1.5. Comparaison entre la panification du blé et de l'amidon aigre de manioc

Pour la panification des céréales, en particulier du blé, une pâte viscoélastique est formée grâce au pétrissage de la farine et de l'eau. La pâte viscoélastique a la capacité de retenir le CO_2 produit par les levures lors de la fermentation ainsi que l'air enfermé dans la pâte pendant le pétrissage. La pâte retient le gaz en raison de la lente vitesse de diffusion du CO_2 à travers les parois des alvéoles de la pâte, empêchant sa libération dans l'atmosphère

(Bertolini, 2000). Les matériaux viscoélastiques alimentaires pouvant retenir des gaz sont généralement des polymères et des réseaux de polymères. Ils peuvent être des protéines comme le gluten dans le pain de blé, des polysaccharides non amylacés tels que les pentosanes dans le pain de seigle ou encore des exopolysaccharides issus de microorganismes souvent ajoutés dans les recettes de pain sans blé (par exemple, le dextran) (Mestres, Rouau, Zakhia, & Brabet, 1996).

Contrairement au blé, l'amidon aigre de manioc ne contient pas de gluten ou autres polymères, à part l'amidon. Sa panification est donc nettement différente, et repose sur l'expansion de bulles de vapeur d'eau retenues par le réseau de molécules d'amidon seules. La production de CO_2 par fermentation n'est pas nécessaire (les recettes de produits panifiés à base d'amidon de manioc n'utilisent d'ailleurs pas de levures), et le pétrissage est suivi directement de la cuisson, sans les étapes de pointage et d'apprêt. La section 2.3.3 présente plus en détails les mécanismes de panification du blé et de l'amidon aigre de manioc.

2.3.2. La capacité de panification

Les boulangers et fabricants de pain, y compris le pain d'amidon aigre, considèrent la capacité de panification comme le principal critère de qualité (Dufour *et al.*, 1996; Laurant, 1992).

La capacité de panification de l'amidon aigre est définie comme « l'aptitude d'un amidon fermenté à augmenter le volume d'une pâte préparée avec cet amidon lors de la cuisson » (Chuzel, 2001; Laurant, 1992). Pour l'amidon aigre, les traitements post-récolte de fermentation et de séchage solaire influencent nettement (augmentation) la capacité de panification (Bertolini *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 2000).

La capacité de panification est déterminée par le volume spécifique des pains d'amidon aigre obtenus après cuisson (Bertolini *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 1988; Cárdenas & de Buckle, 1980; Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 2000). Elle est calculée par le rapport : volume du pain / poids du pain (mL/g) (Vanhamel, Ende, Darius, & Delcour, 1991).

Les travaux de Nunes & Cereda (1994) ont conduit à une classification en trois catégories de la capacité de panification de l'amidon aigre de manioc vis-à-vis du volume spécifique des pains : faible (≤ 5,0 mL/g), moyenne (de 5,0 à 10,0 mL/g) et grande (≥ 10,0 mL/g).

Pour la mesure du volume du pain, les tests les plus répandus sont les méthodes de déplacement d'un volume des semences au travers d'un volumètre à déplacement connu sous le nom de pycnomètre (Vanhamel *et al.*, 1991). Cet appareil est composé d'un récipient de volume connu, qui a été préalablement étalonné avec une semence appropriée, généralement avec des graines de colza ou d'orge perlé (Cornford, 1969).

2.3.3. Le mécanisme d'expansion en panification

Le degré d'expansion de produits panifiés résulte de l'équilibre entre deux forces (Fan, Mitchell, & Blanshard, 1996a, 1996b) : une force d'expansion FE, et une force limitant l'expansion FC. Au début de l'expansion, FE est supérieure à FC (FE > FC), et la pâte augmente de volume. Au cours de l'expansion FE diminue et/ou FC augmente, jusqu'à ce que FE et FC deviennent égales (par exemple FC augmente à mesure que les parois des bulles de gaz s'étirent et s'approchent de leur limite d'élasticité). A ce point l'expansion s'arrête. Enfin, si FC devient plus grande que FE (FE < FC), la pâte gonflée se contracte, ce qui est en général indésirable. La contraction de la pâte est évitée par un changement de la structure de la pâte, qui fige le produit dans son état gonflé (par exemple, la rupture des parois des bulles ayant atteint leur limite d'élasticité laisse s'échapper les gaz, évitant la contraction du produit).

2.3.3.1. Le mécanisme de panification du blé

Le blé est la céréale la plus utilisée pour la fabrication du pain (Cauvain & Young, 2007). La pâte à base de farine de blé est quasiment la seule à posséder des propriétés viscoélastiques qui permettent la formation de la structure d'une miche de pain de bonne qualité (Kokelaar, van Vliet, & Prins, 1996). Cette pâte a la capacité de retenir les gaz produits par les levures lors de la fermentation pendant une longue période (Bloksma, 1990), grâce à la formation d'un réseau de protéines de gluten (Gallagher, Gormley, & Arendt, 2004; Liu, Sheperd, & Rathjen, 1996; MacRitchie, 1989; Miyazaki *et al.*, 2006)

L'amidon est le composant majoritaire de la pâte à pain et interagit avec le gluten pour déterminer la texture du produit (Miyazaki *et al.*, 2006). L'amidon dilue le gluten à un niveau approprié, et absorbe l'eau à partir du gluten au cours de la gélatinisation, rendant ainsi poreux le réseau de gluten et laissant les gaz s'échapper de la pâte en fin de cuisson, de sorte que le pain ne s'effondre pas en refroidissant (Sandstedt, 1961).

Le mécanisme de panification du blé peut s'expliquer de la manière suivante :

Le pétrissage transforme la farine et l'eau en une pâte viscoélastique cohésive, dans laquelle sont réparties de manière aléatoire des micro-bulles gazeuses (Bloksma, 1990). On considère qu'une matrice d'amidon-gluten entoure et stabilise ces bulles de gaz (Bloksma, 1990; Hoseney, 1992) **(Figure 9)**. En fin de pétrissage, les parois des alvéoles gazeuses sont recouvertes d'un film liquide contenant des molécules tensioactives. Ainsi, en cas de rupture de la matrice protéique sous l'effet de la pression de gaz carbonique, le film constitue une barrière imperméable aux gaz et s'oppose à leur échappement **(Figure 9).**

La production de CO_2 par les levures, lors de la fermentation de la pâte (pointage et apprêt), entraîne une augmentation du volume des cellules de rétention du gaz, et

l'expansion de la pâte (force d'expansion FE). Un excès de pression dans les cellules de rétention de gaz par rapport à la pression atmosphérique est nécessaire à cette expansion (Bloksma, 1990).

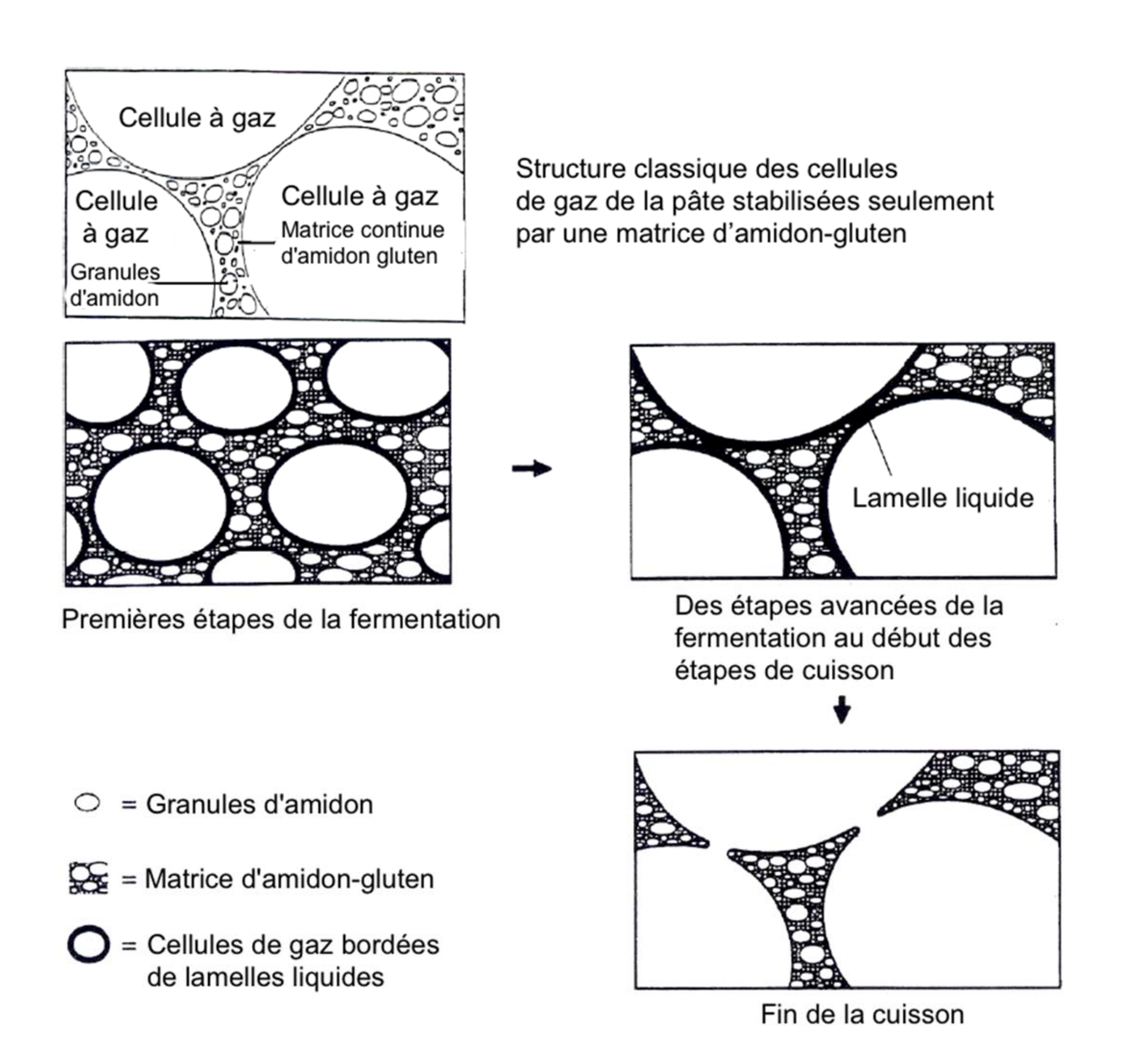


Figure 9. Structure classique de la pâte (figure du haut) (Bloksma, 1990) ainsi que le modèle de double couche montrant le rôle de la matrice gluten-amidon et de la lamelle liquide lors de la stabilisation des cellules de gaz de la pâte à pain (Gan *et al.*, 1990; Gan, Ellis, & Schofield, 1995).

Le processus de cuisson comprend deux phases : (1) Une expansion finale de la pâte due à l'augmentation de la température et à la dilatation des gaz retenus dans les cellules : le CO_2 libéré par la fermentation, mais aussi la vapeur d'eau formée lorsque la température dépasse 100°C. (2) L'ouverture des bulles du fait de la pression et de l'absorption d'eau par les molécules d'amidon en cours de gélatinisation, ce qui arrête

l'expansion. Sevenou, Hill, Pesheck, Enz, & Mitchell (2002) ont décrit la pâte en expansion comme une mousse formée de cellules de gaz fermées indépendantes, et la fin de l'expansion comme une transition de la structure de mousse vers une structure d'éponge formée de cellules ouvertes interconnectées.

2.3.3.2. Le mécanisme de panification de l'amidon aigre

La panification de l'amidon aigre trouve son origine dans la dégradation de l'amidon engendrée par les traitements post-récolte de fermentation et irradiation UV. Ces traitements entraînent une diminution du poids moléculaire de l'amidon par rapport à l'amidon natif et un effondrement plus important de la structure des granules d'amidon au cours de la gélatinisation. Par conséquent, les molécules d'amidon forment plus facilement un film emprisonnant les bulles de vapeur d'eau qui se forment pendant la cuisson, et qui contrôlent l'expansion de la pâte (Bertolini *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2009).

Contrairement au pain de blé, le pain d'amidon aigre de manioc est préparé sans fermentation ni production de CO_2. L'expansion (force FE) est contrôlée par la dilatation de bulles de vapeur d'eau formées pendant la cuisson, sous l'effet de l'augmentation de la température (**Figure 10**). La force limitant l'expansion (FC) est une combinaison de la viscosité de la pâte et du module élastique du matériau. Le degré d'expansion est contrôlé par la limite d'élasticité des parois des bulles : lorsque les parois arrivent à leur point de rupture, la vapeur d'eau s'échappe, ce qui abaisse la teneur en eau et rigidifie la matrice d'amidon (transition caoutchouc – verre), figeant le système dans son état expansé. L'amidon de manioc forme de meilleurs films et a une limite d'élasticité plus élevée, comparé à d'autres amidons (Tran *et al.*, 2009) ce qui peut expliquer ses meilleures propriétés d'expansion.

Ainsi, plusieurs phénomènes contrôlent l'expansion de l'amidon aigre de manioc lors de la cuisson. En premier lieu, la force d'expansion trouve son origine dans la pression de la vapeur d'eau qui reste piégée et qui augmente avec la température. En second lieu, les transitions thermiques modifient les propriétés thermomécaniques de la pâte, affectant le comportement rhéologique et l'expansion de la pâte. Finalement, la perméabilité de la pâte dépend des conditions des pertes d'eau du réseau de la mie qui contrôlent la fin de l'expansion (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001).

Les facteurs physico-chimiques influant sur la panification de l'amidon aigre incluent la réduction du poids moléculaire de l'amidon, le degré d'oxydation (formation de groupements carbonyles et carboxyles), la quantité d'acides organiques formés pendant la fermentation, etc. (Demiate *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 2000; Mestres & Rouau, 1997; Plata-Oviedo & Camargo, 1998; Ramirez Asheri & Vilela, 1995). Ces travaux indiquent qu'une dégradation partielle de l'amidon (oxydation, réduction du poids

moléculaire) est nécessaire pour obtenir la propriété de panification. On peut également noter que l'amidon natif de manioc ne panifie pas, ou peu (**Figure 10**). Cependant un seuil optimum de dégradation semble exister, au-delà duquel la capacité à panifier diminue à nouveau (Camargo *et al.*, 1988).

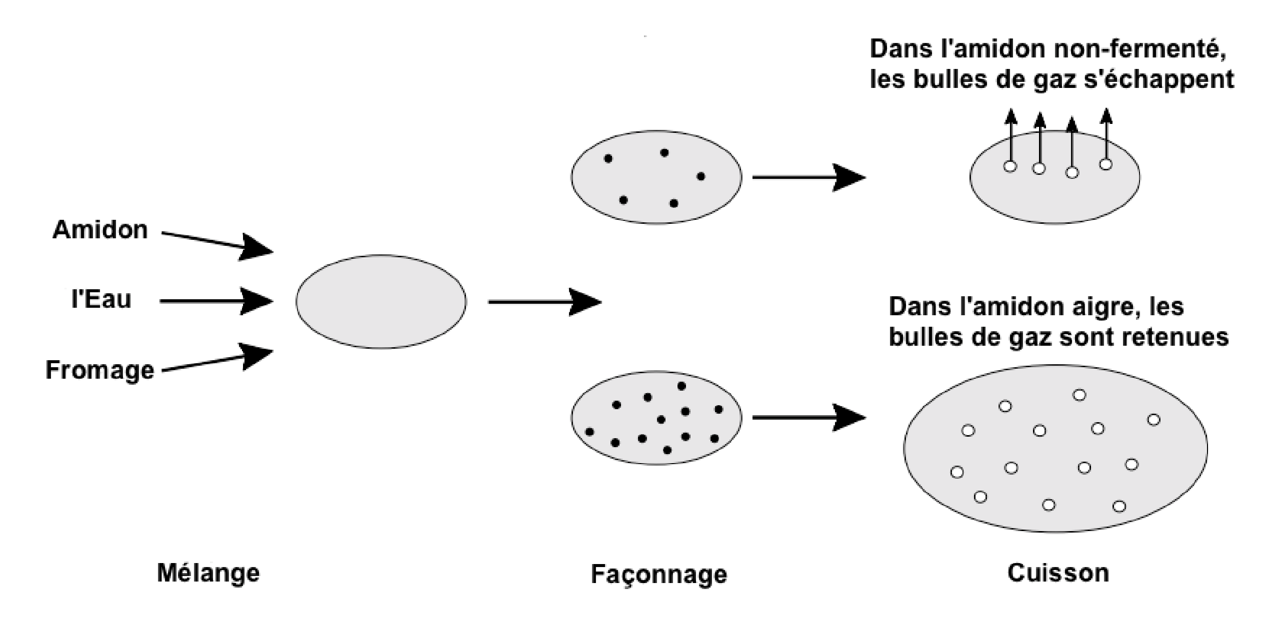


Figure 10. Le mécanisme d'expansion présumé de la pâte de *pandebono* lors de la cuisson (Mestres *et al.*, 1996). Les points noirs représentent des micro-bulles de gaz retenues dans la pâte lors du pétrissage.

Plusieurs travaux indiquent qu'il est nécessaire de combiner les deux traitements, fermentation et séchage solaire, pour obtenir une bonne panification de l'amidon aigre de manioc (Bertolini *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 1988; Cárdenas & de Buckle, 1980; Dufour *et al.*, 1996; Marcon *et al.*, 2009; Plata-Oviedo & Camargo, 1998; Demiate *et al.*, 2000; Vatanasuchart *et al.*, 2005). Ainsi, la capacité de panification d'amidons de manioc natifs, ou seulement fermentés, ou seulement séchés au soleil est de l'ordre de 2-6 mL/g, contre 8-18 mL/g pour des amidons de manioc fermentés et séchés au soleil.

Enfin, la propriété de panification de l'amidon de manioc peut aussi être obtenue par des traitements de substitution : acidification (acides lactique, acétique, butyrique ; acide chlorhydrique) pour remplacer la fermentation, et irradiation UV (UVBA 280-420nm, UVB 310-330nm, UVC 254nm) pour remplacer le séchage solaire (Bertolini *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 1988; Cárdenas & de Buckle, 1980; Dufour *et al.*, 1996; Marcon *et al.*, 2009; Plata-Oviedo & Camargo, 1998 ; De Sena Aquino, Pereira, Watanabe, & Amante, 2013; Franco *et al.*, 2010). La combinaison de l'acidification et de l'irradiation UV permet d'obtenir une panification acceptable, mais qui reste inférieure à la combinaison fermentation-séchage solaire.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

3.1. Origine des échantillons.

Cette étude a été réalisée avec 13 génotypes de manioc provenant de la banque génétique de germoplasme de l'International Center for Tropical Agriculture (CIAT, Cali, Colombie). La plupart de ces génotypes ont été améliorés grâce à des approches classiques de sélection. Trois génotypes dits « de plaine » : HMC-1, CM6438-14, et CM4574-7 ont été récoltés dans la propriété Agrovelez, à Jamundi, département du *« Valle del Cauca »* à 24 km de Cali (**Figure 11**). Ces génotypes ont été cultivés à 1000 m d'altitude et étaient âgés de 12 mois au moment de la récolte. Les 10 autres génotypes dits « d'altitude » : CM7438-14, CM7436-7, SM1498-4a, CM7138-7, SM7591-5, Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5, SM1058-13 et Tambo 4, ont été récoltés dans la commune de Morales, département du Cauca, situé à 41 km de Popayan (**Figure 11**). Ces génotypes ont été récoltés après 15 mois de culture à 1700 m d'altitude. Toutes les espèces ont été récoltées entre octobre et novembre 2009.

La différence d'âge des plantes au moment de la récolte (3 mois) a été considérée comme suffisamment réduite pour ne pas avoir d'effet significatif sur les propriétés de l'amidon, de sorte que les effets du lieu de culture et du génotype étaient prédominants.

Les génotypes de plaine n'ont pas été cultivés en altitude, et vice-versa, parce que le manque d'adaptation à l'un des environnements aboutit à de faibles rendements à l'hectare, et rend peu réalistes ces expérimentations du point de vue de la production agricole. Les essais en champs étant relativement coûteux (en temps de culture, gestion des parcelles, etc.), il n'a pas été possible d'effectuer toutes les expérimentations souhaitables, bien que cette approche limite le nombre de contrôles et ne permette pas de séparer entièrement les différences génotypiques et environnementales.

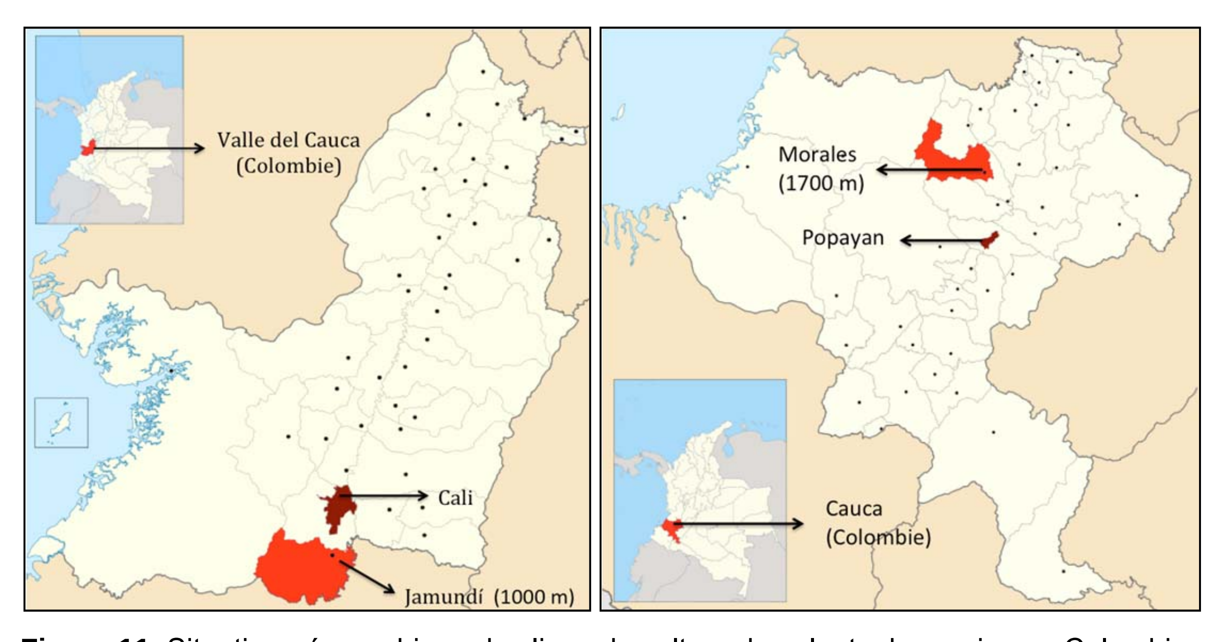


Figure 11. Situation géographique des lieux de culture des plants de manioc en Colombie.

Le tableau suivant (**Tableau 10**) résume les caractéristiques d'origine et de culture des échantillons :

Tableau 10.
Caractéristiques d'origine et de culture des échantillons.

Génotypes	Lieu de culture	Altitude	Âge de la plante à la récolte	Période de récolte	Rendement de la plante [a] (t/ha)	Rendement de l'amidon [b] (%)
Plaine						
HMC-1	Jamundi, Valle del Cauca	1000 m	12 mois	oct-09	32,9	15,1
CM6438-14					41,4	15,9
CM4574-7					40,2	16,7
Altitude						
CM7438-14	Morales, Cauca	1700 m	15 mois	nov-09	15,8	24,6
CM7436-7					8,9	23,2
SM1498-4a					27,8	22,3
CM7138-7					4,5	-
SM7591-5					18,8	18,5
Cumbre 3					17,9	23,6
SM707-17					23,1	21,9
SM1495-5					41,2	21,0
SM1058-13					15,8	19,6
Tambo 4					17,4	20,8

[a] La projection du rendement par hectare a été effectué avec une densité d'ensemencement de 12500 plantes. Le nombre des plantes réellement plantées pour les variétés de plaine et d'altitude a été respectivement 300 et 200. L'aire d'ensemencement par plante a été de 0,8 m^2 (distance entre plants 1,0 m x 0,8 m).
[b] Calculé à partir du rapport entre le poids du manioc épluché et le poids de l'amidon extrait du manioc.

3.2. Traitements des échantillons pour les analyses.

Après la récolte les échantillons ont été transportés à l'unité de traitement traditionnel de l'amidon appelée « *Rallandería* » située dans la municipalité de Mondomo, à une altitude de 1300 m dans le département du Cauca. Dans cette *Rallandería* chaque variété a été extraite séparément et pesée avant et après l'extraction afin de déterminer le rendement du procédé. Le procédé d'extraction a été réalisé de la façon suivante :

1. Lavage et épluchage : cette opération est réalisée pendant environ 10 minutes dans un tambour rotatif cylindrique et horizontal soumis à un débit d'eau constant, entre 9,1 et 9,3 L d'eau par kg d'amidon à 12% d'humidité (Da *et al.*, 2012). La capacité du tambour est entre 131 - 184 kg de matière entrante (pulpe) par heure (Da *et al.*, 2012). L'épluchage, permettant d'éliminer les écorces externes et internes de la racine de manioc, est réalisé par

le frottement des racines les unes contre les autres et contre la paroi du tambour. En même temps, le lavage est réalisé pour éliminer les copeaux, la terre et les autres impuretés adhérant aux racines.

2. Râpage : le manioc est râpé en utilisant un appareil traditionnel appelé « *Rallo* », il s'agit d'un cylindre dont la surface rugueuse est en acier inoxydable. Le râpage est une opération qui nécessite la présence d'eau en continu, entre 2,8 et 3,0 L d'eau par kg d'amidon à 12% d'humidité (Da *et al.*, 2012). Le manioc râpé est ensuite déposé dans un réservoir de stockage où il séjourne pendant quelques minutes.

3. Coulage : cette opération permet de séparer par filtration l'eau chargée d'amidon ou « *lechada* » d'un sous-produit, l'« *afrecho* », riche en fibres, impuretés et contenant également des traces d'amidon. Cet appareil est appelé la « *coladora* ». Il est constitué d'un tambour horizontal perforé qui tourne à une vitesse de 15 à 25 tr/min sous un débit d'eau constant de 29,8 L d'eau par kg d'amidon à 12% d'humidité (Da *et al.*, 2012). L'intérieur du tambour est revêtu d'un tamis de 60 à 120 mesh (correspondant à une taille de maille entre 250 à 125 µm). Le tamis retient dans le tambour uniquement l'« *afrecho* » (Brabet, 1994).

4. Tamisage : après le coulage, un deuxième tamisage est effectué afin d'éliminer les fibres restantes. Le débit d'eau constant pour cette opération est de 29,8 L d'eau par kg d'amidon à 12% d'humidité (Da *et al.*, 2012).

5. Décantation : cette opération s'effectue dans des canaux de sédimentation où le mélange eau - amidon (« *lechada* ») séjourne pendant 24 heures. Cette sédimentation aboutit à l'amidon sédimenté et à un deuxième sous-produit, la « *mancha* ». Ce dernier est constitué d'un mélange riche en amidon, en protéines, en fibres et en lipides. Ce sous-produit est valorisé comme aliment pour animaux (Brabet, 1994).

De la phase sédimentée (partie amylacée) recueillie dans les canaux de décantation, une partie est séchée au four à 40°C pendant 24 heures pour obtenir l'amidon natif de manioc (NO). Une autre partie est séchée au soleil au CIAT pendant environ 12 heures afin d'obtenir l'amidon non fermenté séché au soleil (NS). Pour assurer l'homogénéité du séchage au soleil, l'amidon est étalé sur des lames en plastique (polypropylène) noir.

6. Fermentation : Après les prélèvements pour préparer les échantillons NO et NS, le reste de la phase sédimentée est déposé dans des réservoirs en PVC (100 L). L'addition de la *mancha*, permet d'amorcer la fermentation. Des couvercles sont placés sur les réservoirs afin d'assurer une fermeture hermétique. Cette opération de fermentation est assurée pendant environ 30 jours à température ambiante (environ 25°C). Après la fermentation, l'amidon subit deux traitements : séchage au four pendant 24 heures à 40°C (traitement FO), ou séchage au soleil pendant 12h à la *Rallandería* (traitement FS).

L'amidon qui a suivi le traitement FS, communément appelé « amidon aigre de manioc », possède une propriété d'expansion intéressante et est utilisé dans la fabrication

du pain de manioc notamment au Brésil et en Colombie (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Mestres & Rouau, 1997). L'amidon aigre de manioc correspond à un amidon fermenté par l'action de la flore microbienne lactique en conditions anaérobies (Ampe, Sirvent, & Zakhia, 2001; Guyot, Brizuela, Rodriguez Sanoja, & Morlon-Guyot, 2003), puis séché au soleil.

La **Figure 12** illustre le schéma d'extraction de l'amidon du manioc :

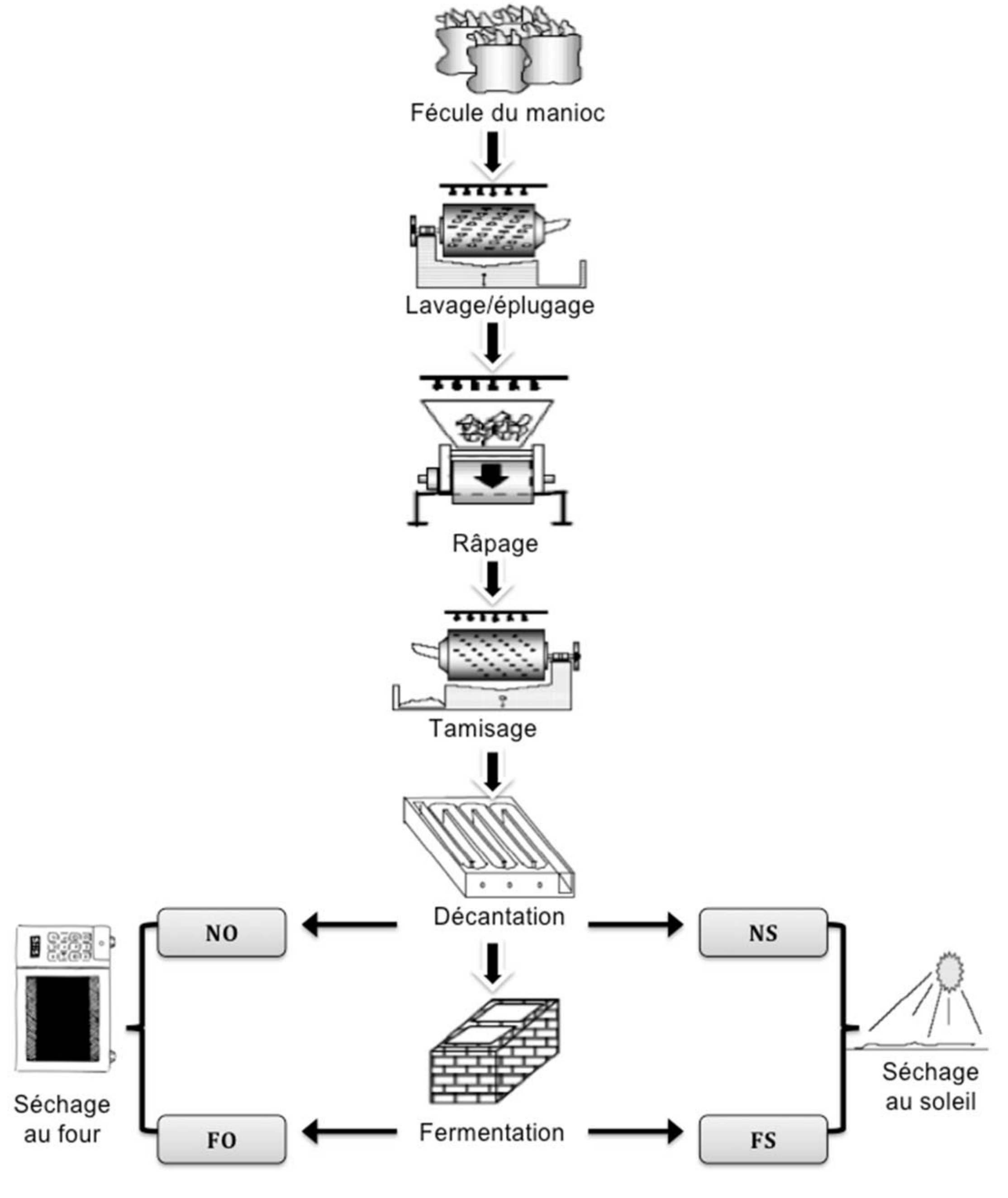


Figure 12. Procédé d'obtention de l'amidon de manioc suivant les différents traitements (modifié d'Alarcón & Dufour, 1998).

Bilan de matière et rendement du procédé de fabrication de l'amidon aigre

Des bilans de matière et de rendement en amidon ont été effectués sur ce procédé. (**Figure 13**).

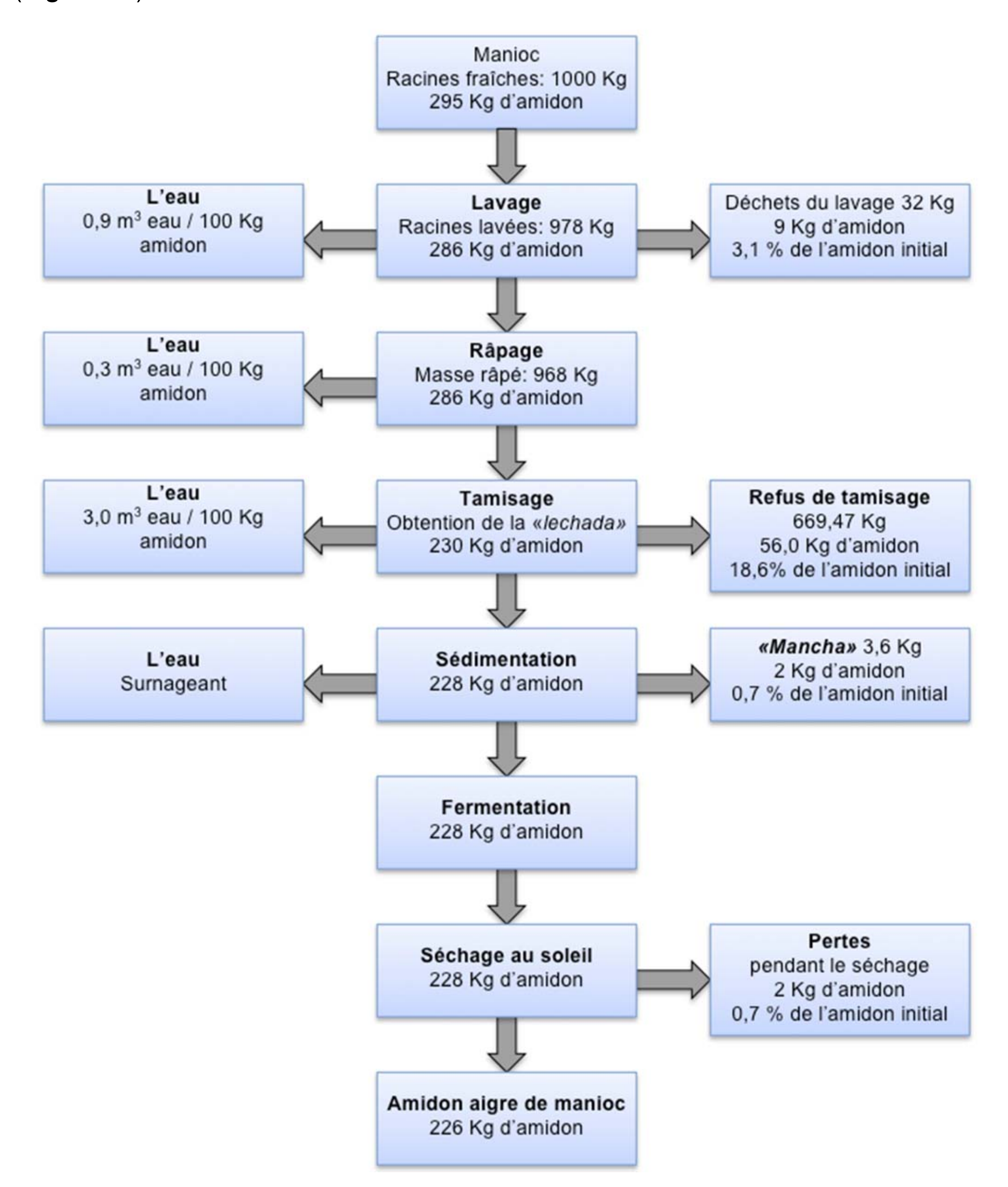


Figure 13. Bilan de matière et rendement du procédé de fabrication de l'amidon aigre (modifié d'Alarcón & Dufour, 1998).

L'entrée initiale est 1000 kg de racines fraîches de manioc, équivalent à une masse de 295 kg d'amidon (teneur en amidon moyenne des racines 29,5%). En général, à la fin du procédé, 226 kg d'amidon aigre ont été récupérés sur les 295 kg d'amidon initial, soit un taux de récupération de 76,7% de la masse d'amidon contenu dans les racines (Alarcón &

Dufour, 1998). Le procédé nécessite 4,1 m^3 d'eau pour traiter 100 kg d'amidon de manioc (Da *et al.*, 2012). Le rapport racines/amidon est de 4,4/1,0 et le rendement du procédé est 22,6% (Alarcón & Dufour, 1998).

3.3. Analyses des échantillons.

3.3.1. Capacité de panification.

Le volume des pains préparés avec de l'amidon de manioc est nettement plus élevé lorsque de l'amidon a subi les traitements de fermentation et séchage solaire (Bertolini *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2009). Mesurer ce volume est donc une donnée essentielle pour caractériser les effets de ces deux traitements. Le paramètre choisi à cet effet est le volume massique, c'est-à-dire le volume du pain rapporté à sa masse, et dénommé « capacité de panification ».

Les lipides pouvant avoir un effet limitant sur le gonflement de la pâte à pain du fait de la formation de complexes amylose-lipides (Tester & Morrison, 1992), la capacité de panification a également été utilisée pour vérifier le lien entre l'utilisation de lipides et la panification. Deux protocoles, l'un sans lipides et le second avec lipides, ont été établis à cet effet.

3.3.1.1. Formulation avec de l'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC) et sans lipides.

D'après Tester & Morrison (1992) les lipides limitent la capacité de panification. Pour confirmer cette propriété, une formulation sans lipides a été effectuée en les remplaçant par de l'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC). L'HPMC est un additif alimentaire, il a été utilisé pour améliorer l'homogénéité de la pâte et éviter la formation de croutes après cuisson (BeMiller & Whistler, 2009; Simsek, Baek, Hareland, Ohm, & Eun Jung, 2011)

La pâte à pain a été préparée au CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) selon le protocole donné par Bertolini, Mestres, & Colonna (2000). Une prise d'essai de 11 g d'amidon (soit 51,6% du poids de la pâte totale) en matière sèche (m.s.) a été mélangée avec 1,3 g d'HPMC (Acros Organics 24402) et 9 g d'eau distillée (42,3% du poids de la pâte totale) et homogénéisée dans une capsule en aluminium (diamètre 64 mm, hauteur 18 mm et épaisseur 0,1 mm). La gamme de teneurs en eau de différents échantillons testés est comprise entre 6 et 15%. La masse d'eau distillée a été ajustée pour chaque amidon pour tenir compte de sa teneur en eau. Les capsules contenant la pâte ont été cuites au four à 243°C pendant 15 minutes, puis refroidies pendant 20 minutes à température ambiante. Les poids et volumes des pains ont été mesurés avec une balance et un pycnomètre utilisant des graines de chou-fleur. La

capacité de panification a été calculée par le rapport : volume du pain / poids du pain (mL/g). Les moyennes sur 3 réplicas ont été calculées.

Le four utilisé pour ces expériences est un four HMI Thirode EMERAUD III gaz-électrique.

3.3.1.2. Formulation avec pré-gélatinisation et en présence de lipides.

Ce protocole de panification reproduit une formulation boulangère traditionnellement utilisée en Colombie correspondant à une formulation avec pré-gélatinisation de l'amidon et ajout de lipides. Les lipides ont la capacité de former des complexes avec l'amylose de l'amidon et limitent le gonflement de la pâte comme l'ont montré Tester & Morrison (1992).

La pâte à pain a été préparée au CIAT selon le protocole suivant (protocole non publié, CIAT) : d'une part, 125 g d'amidon (12 - 13% de teneur en eau), 75 g de fromage « *Costeño* » et 18,7 g d'huile de tournesol ont été mélangés à la main sur une plaque en acier inoxydable. D'autre part, l'amidon pré-gélatinisé a été préparé en mélangeant 37,25 g d'amidon (matière sèche) avec 31,25 g d'eau froide et 31,25 g d'eau bouillante rajoutés lentement en remuant avec une cuillère. Les deux fractions (amidon natif et amidon pré-gélatinisé) et 100 mL d'eau froide supplémentaires ont été mélangés de façon homogène (**Figure 14**). A partir de la pâte obtenue, 12 anneaux de 33 g ont été façonnés, chacun de 18 cm de périmètre et de 2 cm d'épaisseur. La pâte a été cuite dans un four à 260°C pendant 13 min, puis refroidie pendant 20 minutes à température ambiante. Les poids et volumes des pains ont été mesurés avec une balance et un pycnomètre.

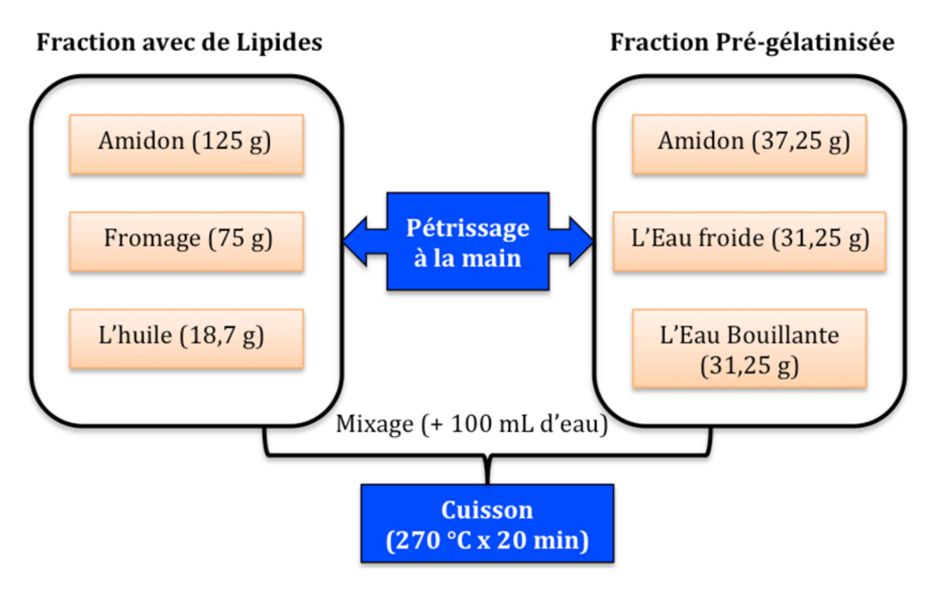


Figure 14. Recette boulangère avec prégélatinisation (à droite) et lipides (à gauche).

Les volumes des pains ont été déterminés à l'aide d'un pycnomètre (Vanhamel *et al.*, 1991) permettant la mesure du déplacement d'un volume de graines de chou-fleur lorsqu'un

pain est placé dans l'appareil (Brabet, 1994). Il a l'avantage de ne pas engendrer de forces électrostatiques indésirables contre les parois de l'appareil, ce qui améliore la fiabilité des mesures.

La capacité de panification a été définie par le rapport : volume du pain / masse du pain (mL/g). Les moyennes sur 12 réplicas (1 réplication, 1 anneau) ont été calculées.

3.3.2. Détermination de la matière sèche.

Principe.

La matière sèche est un critère de qualité pour les amidons. La méthode utilisée pour ce projet est la méthode 44-01.01 de l'AACC (American Asssociation of Cereal Chemist, 1983a). Elle consiste en un séchage au four sous conditions standardisées ; la perte de poids est déterminée quantitativement par pesée.

Protocole.

La quantité de matière sèche a été déterminée au CIAT selon la méthode AACC 44-01.01 : une prise d'essai de 2 g environ d'amidon homogénéisé (teneur en eau connue), a été séchée dans une étuve ventilée à 105°C pendant 24 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur à la température du laboratoire, une nouvelle pesée de l'échantillon a été effectuée. La quantité de matière sèche a été déterminée par différence de masse de la façon suivante :

$$\%Humidité = \frac{Mh - Ms}{Mh} \times 100 \qquad (1)$$

Où : *Mh = Masse de l'échantillon humide (g)*

Ms = Masse de l'échantillon séché (g)

$$\%\ matière\ sèche = 100 - \%\ Humidité \qquad (2)$$

La moyenne sur 3 réplicas a été calculée.

3.3.3. Mesure du pH.

Pendant le traitement de fermentation, la production d'acide lactique et d'autres acides organiques fait baisser le pH des amidons (Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 2000). En revanche, lors du séchage solaire, l'amidon fermenté subi une augmentation du pH (Dufour *et al.*, 1995). Afin de quantifier ces phénomènes, le pH des échantillons a été mesuré.

Principe.

Le pH mesure l'activité chimique des ions hydronium (H_30^+) (appelés aussi couramment protons en solution). Les valeurs du pH sont déterminées grâce à un pHmètre

qui mesure la différence de potentiel entre deux électrodes : une électrode de verre mesurant un potentiel lié au pH et une électrode de référence de potentiel constant. Le pH est une mesure de l'acidité ou la basicité d'une solution sur une échelle de 0 à 14. Il est défini comme le logarithme décimal de l'inverse de la concentration molaire des ions hydronium (Brabet, 1994).

Protocole.

Ce protocole est basé sur la méthode 02-52 de l'AACC (American Asssociation of Cereal Chemist, 1983b). Une prise d'essai de 10 g en matière sèche (m.s.) d'amidon homogénéisé, a été dispersée dans 100 mL d'eau distillée sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Cette suspension aqueuse (10% m/v) a été filtrée avec du papier filtre Whatman N°1. 50 mL de ce filtrat ont été prélevés pour mesure du pH à l'aide d'un pH-mètre Titroline 96 (Schott, Allemagne).

Pour chaque échantillon 3 mesures ont été effectuées.

3.3.4. Teneur en groupements carbonyle et carboxyle.

Lors du séchage solaire, l'amidon peut être oxydé par irradiation UV (Demiate *et al.*, 2000; Guerra-Dias *et al.*, 2011). Afin de vérifier cette oxydation, les teneurs en groupements carbonyle et carboxyle ont été mesurées.

Principe.

La teneur en groupements carboxyle et carbonyle sont des indicateurs du degré d'oxydation (Kuakpetoon & Wang, 2006). L'effet de la fermentation et/ou séchage solaire sur les amidon de manioc entraîne une oxydation qui entraîne la formation de groupements carbonyle et carboxyle (Guerra-Dias *et al.*, 2011).

La mesure de la teneur en groupements carbonyle est basée sur une réaction de condensation qui se produit au cours de la mesure : de l'hydroxylamine en excès réagit avec les groupements carbonyles, ce qui entraîne la formation d'oxime et d'eau (Smith, 1967). L'excès d'hydroxylamine est ensuite titré avec de l'acide chlorhydrique.

La méthode de titration des groupements carboxyle et carbonyle de Smith (1967) peut être utilisée pour la détection de l'oxydation dans l'amidon. D'après L. Wang & Wang (2001), la teneur en groupements carboxyle est liée à la fragmentation moléculaire au cours du processus d'oxydation.

La détection des groupes carbonyle et carboxyle dans les échantillons modifiés par fermentation et séchage au soleil (FS) permettrait de mettre en évidence l'effet oxydant de ces procédés. Les échantillons FS sont les plus susceptibles de montrer des différences car ils sont les plus modifiés, ils ont donc été analysés en priorité.

3.3.4.1. Teneur en groupements carbonyle.

Protocole.

La quantité de groupements carbonyle est déterminée suivant la méthode titrimétrique de Smith (1967). 4 g d'échantillon d'amidon (matière sèche) sont lavés et mis en suspension dans 100 mL d'eau distillée. La suspension est gélatinisée dans un bain d'eau bouillante pendant 20 min, refroidie à 40°C, et ajustée à pH 3,2 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1 N). La réaction de condensation est initiée par l'ajout de 15 mL de réactif d'hydroxylamine. La suspension est ensuite placée dans un bain thermostaté à 40°C pendant 4 h sous agitation lente. L'hydroxylamine réagit avec les groupements carbonyles, ce qui entraîne la formation de l'oxime + de l'eau. L'excédent d'hydroxylamine est rapidement déterminé par titration du mélange jusqu'à pH 3,2 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1 N). Un blanc est réalisé avec le réactif d'hydroxylamine seul. Le réactif d'hydroxylamine est préparé en dissolvant 25 g de chlorhydrate d'hydroxylamine (Acros Organics 27010) dans 100 mL de soude (NaOH 0,5 N) et le volume final est ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée. La teneur en carbonyle correspond au nombre de moles de carbonyle par mole d'unités de glucose (mol CO/mol GU). Elle est exprimée en pourcentage et est calculée à partir de l'équation suivante :

$$molCO / molGU = \frac{(Vb \times Cb) - (Vé \times Cé)}{Wé / M(GU)} \quad (3)$$

Où : *V* = volume de titration (L)

C = concentration de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la titration ($mol.L^{-1}$)

b = blanc = solution de chlorhydrate d'hydroxylamine

é = échantillon = FS

W = masse en base sèche (g)

M(GU) = Masse molaire d'une unité glucose = 162 g/mol

3.3.4.2. Teneur en groupements carboxyle.

Protocole.

Les quantités de groupements carboxyle contenues dans les amidons sont déterminées par la procédure décrite par Smith (1967). L'échantillon d'amidon (5 g matière sèche) est mis en suspension dans 25 mL d'acide chlorhydrique (0,1 M) pendant 30 min. La suspension est filtrée à travers un entonnoir de Büchner constitué d'un milieu poreux en verre et le résidu est lavé avec de l'eau distillée jusqu'à élimination des ions chlorure (la neutralité de la solution est vérifiée à l'aide de papier pH et l'absence d'ions chlorure par ajout de nitrate d'argent dans l'eau de lavage recueillie sous l'entonnoir). Ce résidu lavé est ensuite mis en suspension avec 300 mL d'eau distillée. La suspension est chauffée dans un

bain d'eau bouillante sous agitation continue pendant 15 minutes pour assurer la gélatinisation complète. La suspension est ensuite refroidie et maintenue à 40°C dans un bain-marie pendant 1 heure. Enfin, l'échantillon est titré jusqu'à pH 8,2 à l'aide d'une solution de soude (NaOH 0,01 mol/L).

La teneur en groupements carboxyle ajoutés par le traitement FS est exprimée en nombre de moles de carboxyle par moles d'unités de glucose (mol COOH/mol GU). Elle est exprimée en pourcentage et est calculée à partir de l'équation suivante :

$$molCOOH / molGU = ((Vé \times Cé / Wé) - (Vb \times Cb / Wb)) \times M(GU) \qquad (4)$$

Où : *V* = volume de titration (L)

C = concentration de la solution de soude utilisée pour la titration ($mol.L^{-1}$)

b = blanc (NO)

é = échantillon (FS)

W = masse en base sèche (g)

M(GU) = Masse molaire d'une unité glucose = 162 g/mol

Remarque : La teneur en carbonyle dans les amidons natifs (NO) a été supposée négligeable, contrairement à la teneur en carboxyle, d'où l'utilisation de blancs différents pour les deux déterminations.

3.3.5. Propriétés thermiques et teneur en amylose (DSC).

La structure cristalline des amidons demeure inchangée au cours des traitements (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009). L'évaluation des températures et de l'enthalpie de gélatinisation mesurées par DSC permettra de vérifier ou infirmer cette hypothèse.

La teneur en amylose des amidons est également inchangée au cours des traitements (Franco *et al.*, 2010). La DSC a été utilisée pour quantifier la teneur en amylose des échantillons et vérifier ou infirmer cette hypothèse.

Principe.

Stevens & Elton (1971) ont été les pionniers de l'utilisation de la DSC pour la mesure de la gélatinisation et rétrogradation de l'amylopectine de l'amidon. Depuis, la DSC s'est avérée être un outil extrêmement important pour la mesure de la cristallinité de l'amidon gélatinisé et rétrogradé, pour la détermination des cinétiques de rétrogradation et pour l'étude des facteurs influençant la rétrogradation (Jang & Pyun, 1997; Obanni & Bemiller, 1997).

La DSC mesure la direction et l'ampleur du flux d'énergie thermique fourni à l'échantillon lorsque l'on fait varier la température. Cette analyse permet de détecter les

transitions thermiques de premier ordre (fusion, cristallisation) et de deuxième ordre (transition vitreuse) (BeMiller & Whistler, 2009; Russell & Oliver, 1989).

Dans le cas de l'amidon, les paramètres DSC fournissent des informations sur la cohésion de la structure du granule d'amidon (Marcon *et al.*, 2009). La cohésion se réfère à la capacité des grains d'amidon à se déstructurer par traitement hydrothermique. Les paramètres DSC sont des indicateurs de la structure cristalline du granule d'amidon, ainsi que, le cas échéant, de sa dégradation au cours des traitements post-récolte (Marcon *et al.*, 2007; Mestres & Rouau, 1997; Nwokocha, Aviara, Senan, & Williams, 2009).

L'enthalpie de gélatinisation (ΔH) est reliée à la fusion de la structure cristalline et par conséquent ΔH augmente lorsque la cristallinité augmente (Zobel *et al.*, 1998). Cependant, il a été montré (par RMN et diffraction aux rayons X) que ΔH reflète la perte d'ordre de la structure double-hélice plutôt que la cristallinité (Cooke & Gidley, 1992). Ce paramètre est lié à la quantité de cristallites dans le granule d'amidon et dépend des liaisons intermoléculaires cristallines (Moorthy, 2002). La température de gélatinisation (T_o) reflète la stabilité des doubles-hélices d'amylopectine (Moorthy, 2002), qui peut elle-même être reliée à la longueur des chaînes d'amylopectine : une T_o élevée indique une longueur de chaînes d'amylopectine élevée (Taylor, Schober, & Bean, 2006).

Protocole.

Le protocole établi par Mestres & Rouau (1997) a été utilisé. Les analyses DSC ont été effectuées sur un appareil Perkin-Elmer DSC 7 (Perkin-Elmer, Norwalk, VA) (cf. **Figure 15**). Les échantillons à analyser (10 mg d'amidon) sont scellés avec 50 µL d'une solution aqueuse (2% v/v) de lyso-phospholipide (L-α-Lysophosphatidylcholine, SIGMA) dans des capsules DSC en acier inoxydable. La capsule d'échantillon et la capsule de référence (contenant de l'air) ont été chauffées de 25 à 160°C à une vitesse de 10°C.min^{-1}, maintenues à 160°C pendant 2 min, puis refroidies jusqu'à 60°C à une vitesse de 10°C min^{-1}.

Les températures et les enthalpies de gélatinisation ont été déterminées en utilisant la phase de chauffage du thermogramme. Trois températures de gélatinisation ont été mesurées : T_o = température d'initiation de la gélatinisation, T_p = température du pic maximal (température pour laquelle la réaction endothermique se produit au maximum) et T_e = température finale, la température à laquelle tous les granules d'amidon sont gélatinisés. La plage de température de gélatinisation (ΔT) a été calculée comme la différence (T_e - T_o) (Cavallini & Franco, 2010). T_o et T_e sont déterminées au point situé à l'intersection de la tangente au point d'inflexion ascendant (respectivement descendant) des pics et de la ligne de base (Relkin, 2006).



Figure 15. Calorimètre différentiel à balayage DSC 7.

Les teneurs en amylose ont été déterminées en utilisant la phase de refroidissement du thermogramme, à partir de l'enthalpie de formation des complexes amylose-lysophospholipide. Les analyses ont été effectuées en double et les valeurs moyennes ont été calculées.

3.3.6. Cristallinité par diffraction aux rayons X.

Les traitements de fermentation et séchage solaire affectent peu les régions cristallines des amidons de manioc (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009). La diffraction aux rayons X permettra de vérifier l'effet des traitements sur la structure cristalline des amidons.

Principe.

La diffraction aux rayons X permet de définir la structure moléculaire de différents types d'arrangements cristallins (Mestres, 1996). Les méthodes de diffractométrie aux rayons X permettent de déterminer le degré de cristallinité des amidons (Gernat, Radosta, Damaschun, & Schierbaum, 1990), par le calcul du ratio entre les domaines cristallins et les zones amorphes du spectre de diffraction (Van Soest, Tournois, De Wit, & Vliegenthart, 1995).

Les caractéristiques tridimensionnelles de la structure cristalline de l'amidon peuvent être identifiées par les modèles de diffraction. Ces modèles sont classifiés selon les types A et B (cf. **Figure 16**) (Imberty, Chanzy, Pérez, Buleon, & Tran, 1987; Imberty & Pérez, 1988).

Dans le modèle cristallin de type-A, la structure est basée sur un arrangement en parallèle des doubles-hélices dans la cellule unitaire, ce qui produit un cristal monoclinique. Dans le modèle cristallin de type-B, la structure est basée sur un arrangement hexagonal de doubles-hélices (Imberty & Pérez, 1988). Bien que la géométrie des doubles-hélices soit identique dans les types A et B, les deux structures diffèrent par le nombre de molécules

d’eau incluses dans la maille cristalline (4 et 36 molécules d’eau par maille, respectivement) (Thomas & Atwell, 1988; Wu & Sarko, 1978a, 1978b).

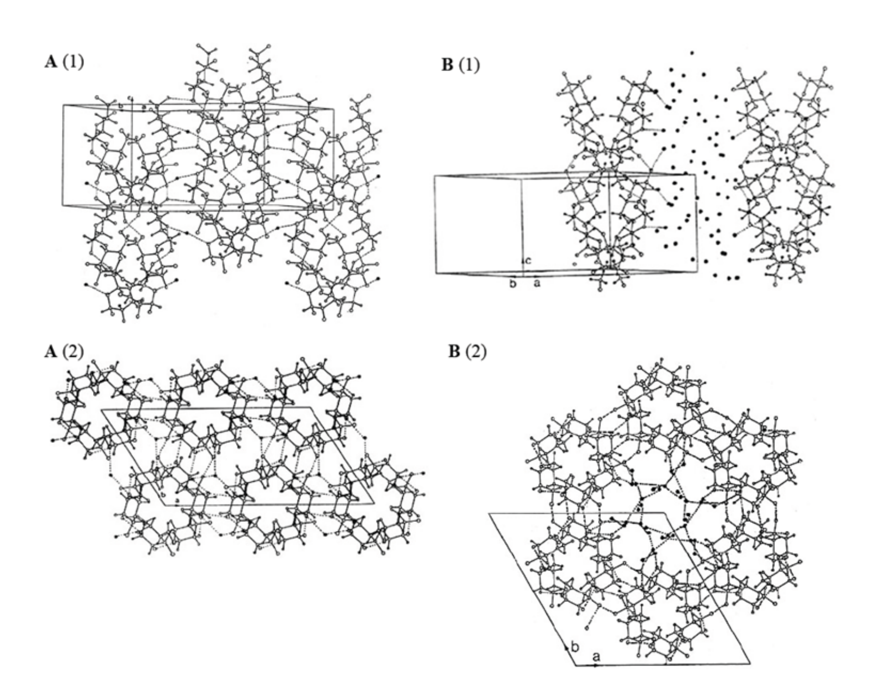


Figure 16. L’arrangement cristallin des types A et B (Imberty, Buléon, Tran, & Pérez, 1991; Imberty *et al.*, 1988; Imberty & Pérez, 1988) (1) représentation tridimensionnelle selon l’axe de fibre, (2) projection de la structure dans le plan (a,b). Les liaisons hydrogène engageant les molécules d'eau sont représentées en pointillés.

Protocole.

Les mesures par diffraction des rayons X (DRX) ont été effectuées selon le même protocole que Pérez *et al.* (2010) sur les amidons de manioc. Afin d’ajuster leur teneur en eau, les échantillons ont été conditionnés sous une humidité relative de 90% ($BaCl_2$) pendant 20 jours sous vide partiel. Les teneurs en eau sont de l’ordre de 20%. Les échantillons (20 mg) ont ensuite été scellés entre deux feuilles de ruban adhésif pour éviter toute modification significative de la teneur en eau durant la mesure.

Les spectres de diffraction ont été enregistrés avec un spectromètre BRUKER (Karlsruhe, Allemagne) D8 Discover. La radiation X Cu Kα1 (λCu Kα1 = 1,5405 A°), produite dans un tube scellé à 40 kV et 40 mA, a été sélectionnée en utilisant une optique primaire constituée de miroirs croisés. Le faisceau, ainsi produit, est collimaté à la taille de 500 µm de diamètre.

Un détecteur bidimensionnel GADDS recueille le faisceau incident émis par l’échantillon durant un temps d'enregistrement de 600 s. L'échantillon et le détecteur formant un angle de 25° (2θ), sont distants de 100 mm et sont fixes. C'est l'intégration de l'intensité

qui permet de tracer le graphe en fonction de l'angle 2θ. La cristallinité relative a été déterminée après la normalisation de tous les diagrammes enregistrés entre les valeurs de 3° et 30° (2θ). De l'amidon de pomme de terre sec extrudé a été utilisé comme standard amorphe. Des amyloses recristallisées présentant des cristaux de type A et B ont été utilisées en tant que standards cristallins. Le degré de cristallinité des structures a été déterminé selon la méthode initialement développée pour la cellulose (Wakelin, Virgin, & Crystal, 1959). Le pourcentage de cristallinité correspond à la pente de la droite (i_{Sample}-I_{amor}) 2θ = f (I_{crys} - I_{amor}) 2θ, où i_{Sample}, I_{amor}, et I_{crys} sont respectivement les intensités diffractées de l'échantillon, de l'amorphe, et des standards cristallins.

3.3.7. Analyse structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR).

Les traitements de fermentation et séchage solaire affectent a priori de façon plus importante la surface des granules d'amidon, plutôt que les parties internes. L'analyse structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) peut permettre de vérifier une éventuelle modification de la structure superficielle des granules (profondeur de pénétration d'environ 2 µm) consécutive aux traitements (Mina, Valadez-González, Herrera-Franco, Zuluaga, & Delvasto (2011) et Mutungi *et al.* (2011)).

La spectroscopie Moyen Infrarouge

Principe.

Le principe de la spectroscopie infrarouge est de mesurer à différentes longueurs d'ondes l'absorption de rayonnement infrarouge à travers le matériau étudié. Les informations apportées sont de nature vibrationnelle car l'absorption infrarouge implique des transitions entre des niveaux d'énergie vibrationnels (Essendoubi, 2007).

L'espèce moléculaire qui interagit avec le rayonnement électromagnétique incident peut être assimilée à un système oscillant (cf. **Figure 17**).

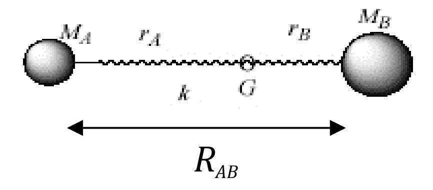


Figure 17. Représentation schématique d'une molécule diatomique : M_A et M_B sont les masses des deux atomes, r_A et r_B les distances entre le centre de chaque atome et le centre de gravité de la liaison G; les deux masses sont reliées par un ressort de constante de raideur k, représentant la liaison chimique entre les deux entités.

De manière très schématique, l'absorption du faisceau incident est soumise à deux conditions principales :

- Le système oscillant doit être caractérisé par un moment dipolaire permanent, tel que :

$$\left(\frac{d\mu}{dr}\right)_{r=rc} \neq 0 \qquad (5)$$

- La fréquence du photon incident doit correspondre à la fréquence de résonance de l'oscillateur.

Lorsque ces deux conditions sont respectées, l'échantillon absorbe alors une partie de la radiation reçue en passant de son niveau énergétique vibrationnel fondamental à un niveau excité (cf. **Figure 18**).

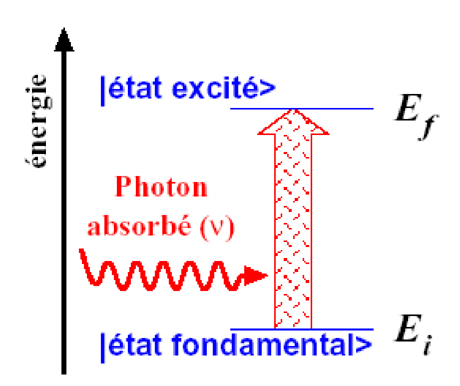


Figure 18. Représentation schématique d'une transition énergétique entre niveaux vibrationnels d'une molécule (E_i = énergie de l'état fondamental, E_f = énergie de l'état excité) à la suite de l'interaction avec un photon incident.

La technique la plus communément utilisée en spectroscopie IR est la mesure directe de la transmission. Cette technique consiste à comparer les intensités incidente I_0 et transmise I_t d'un faisceau infrarouge après passage au travers de l'échantillon (cf. **Figure 19**).

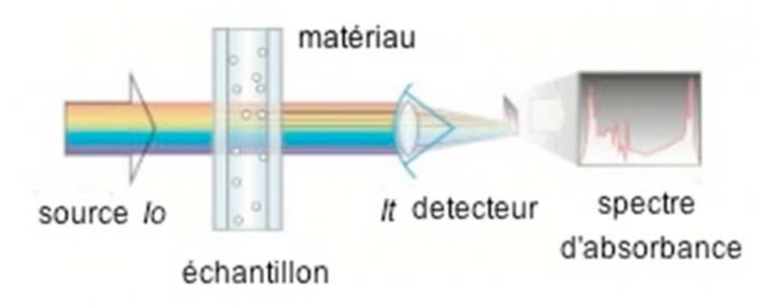


Figure 19. Schéma du principe de la spectroscopie IR en transmission.

La mesure de I_0/I_t donne le spectre d'absorption de l'échantillon analysé. L'absorption A est, d'après la loi de Beer-Lambert, proportionnelle à C (concentration en espèce absorbante de l'échantillon) et x (épaisseur de l'échantillon) :

$$A = \log \frac{I_o}{I_t} = \varepsilon C x \quad (6)$$

Où : ε = coefficient d'extinction molaire.

Cependant, la spectroscopie IR en transmission connait quelques limitations, comme l'échantillonnage de poudres ou de pâtes. C'est la raison pour laquelle la technique de réflexion totale atténuée (ATR) a été choisie pour cette étude.

La spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

Appareillage

La cellule ATR est constituée d'une enclume de diamant qui laisse passer le rayonnement incident et le focalise sur la surface de l'échantillon. C'est le faisceau réfléchi par la surface de l'échantillon qui est détecté et analysé (cf. **Figure 20**). L'échantillon, d'indice de réfraction n_2, est placé en contact direct avec le diamant (matériau transparent dans le domaine d'étude) d'indice de réfraction n_1 élevé, de telle sorte que $n_1 >> n_2$. Si l'angle d'incidence du rayonnement incident est supérieur à une valeur critique $\varphi_c = sin^{-1} (n_2 / n_1)$, alors l'interface réfléchit totalement le faisceau.

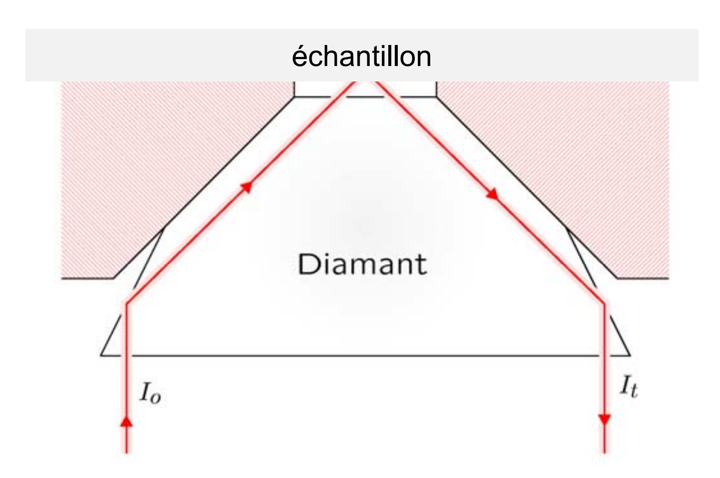


Figure 20. Schéma de la cellule ATR diamant utilisée dans cette étude.

Malgré le phénomène de réflexion, la radiation pénètre dans l'échantillon à une profondeur de plusieurs µm et peut être absorbée.

La profondeur de pénétration de l'onde, d_p, (Sevenou, Hill, Farhat, & Mitchell, 2002) est définie par :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2\theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \qquad (7)$$

Où : λ = longueur d'onde du rayonnement incident = 1/ $\tilde{\nu}$ (m)

$\tilde{\nu}$ = nombre d'onde (m^{-1})

n_1 = constante optique du diamant ≈ 2,38

n_2 = constante optique de l'échantillon ≈ 1,5

θ = angle d'incidence ≈ 45°

Cette profondeur de pénétration n'est pas constante et va dépendre de la longueur d'onde du faisceau. Plus on se placera à des longueurs d'ondes élevées plus la profondeur de pénétration sera importante.

Enfin, il est à noter que certaines différences mineures, en termes de positions et d'intensité de bandes d'absorption, peuvent être observées entre les spectres IR obtenus avec la méthode en transmission et celle en réflexion totale atténuée.

Principe.

La spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), couplée avec des procédures de décompositions spectrales, a été utilisée pour étudier la structure des régions externes des granules d'amidon (Schulz & Baranska, 2009; Sevenou, Hill, Farhat, *et al.*, 2002).

Cette technique donne des informations sur l'organisation de la structure des chaînes polymères à proximité de la surface des granules d'amidon, puisque la profondeur de pénétration du faisceau infrarouge est, dans ce cas, de l'ordre de 2 µm. Ceci implique que les spectres infrarouges sont représentatifs d'une information globale à l'échelle du micron, relative à l'organisation des anneaux de croissance représentant l'alternance entre les lamelles semi-cristallines et amorphes de la partie externe du granule (Sevenou, Hill, Farhat, *et al.*, 2002).

De récents travaux ont été publiés en vue de trouver un lien entre la capacité de panification et les spectres en moyen infrarouge de l'amidon de manioc, parmi eux nous soulignons les suivants :

Grosmaire, Reynes, & Sabatier (2013), qui ont travaillé avec les échantillons de l'étude présentée ici, ont montré que les régions spectrales correspondant à l'ordre cristallin jouent un rôle important dans la capacité de panification. Par ailleurs, d'autres travaux (Demiate *et al.*, 2000; Putri *et al.*, 2012) ont établi seulement une prédiction partielle de la

capacité de panification à partir des résultats de spectroscopie infrarouge. La meilleure corrélation, obtenue dans les deux cas, est restreinte au domaine spectral situé autour de 1600 cm^{-1}, associé aux vibrations d'élongation du groupement carboxyle. D'autre part, Marcon *et al.* (2009) ont montré que l'ATR-FTIR combiné à l'Analyse en Composantes Principales (ACP) permet d'identifier les changements structuraux dans les amidons de manioc natifs, fermentés et séchés au four ou au soleil. Cette synergie peut mettre en évidence les différences ou similitudes entre les échantillons et représente un outil de prédiction pour la capacité de panification.

Protocole.

Les spectres ont été enregistrés dans le domaine 650 – 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 2 cm^{-1} à l'aide d'un spectromètre IRTF Nicolet « Nexus » (Infra Rouge à Transformée de Fourier) équipé d'une platine ATR diamant « Golden Gate » (Specac) et d'un détecteur DTGS. Le nombre d'acquisitions est 64 scans.

3.3.8. Spectrophotométrie UV.

Les bandes d'absorbance UV de l'amidon de manioc peuvent être décalées après les traitements de fermentation ou séchage solaire, ce qui pourrait être lié à une modification de la composition chimique, par exemple suite à l'oxydation d'une partie de l'amidon (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001). Pour vérifier ce phénomène, la spectrophotométrie UV a été utilisée pour analyser les échantillons.

Principe.

Le principe de la spectrophotométrie dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption, la transmittance ou la réflectance du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190 - 400 nm) et au visible (400 - 800 nm) (Di Benedetto, 2007).

L'absorption moléculaire dans le domaine spectral ultraviolet-visible dépend de la structure électronique de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons d'orbitales à l'état fondamental vers des orbitales situées à un état excité d'énergie supérieure (Silverstein, Bassler, & Morrill, 1998). Le spectre UV obtenu représente l'intensité d'absorption ou la transmittance (Brittain, 2006; Silverstein *et al.*, 1998) en fonction de la longueur d'onde. L'intensité d'absorption et la transmittance sont mesurées sur les échantillons des solutions liquides. Pour les échantillons solides (poudres) l'analyse est faite en réflectance.

Dans cette étude nous allons déterminer la réflectance UV des amidons. La réflectance est définie comme le rapport entre le flux de rayonnement réfléchi et le flux de rayonnement incident (Wyszecki & Stiles, 1983). Deux types de réflexions existent (**Figure 21**) : la lumière incidente, réfléchie symétriquement par rapport à la interface de

l'échantillon, est appelée « réflexion spéculaire », tandis que la lumière incidente dispersée dans différentes directions est appelée « réflexion diffuse ».

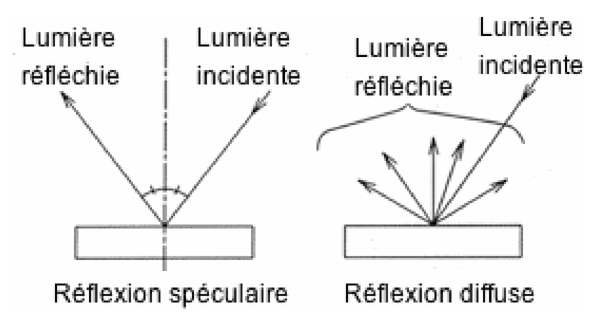


Figure 21. Types de spectrophotométrie en réflectance. D'après Shimadzu Corporation (1999a).

La mesure de la réflexion spéculaire est souvent utilisée pour l'évaluation des semi-conducteurs et des matériaux optiques par rapport à une surface réfléchissante de référence. L'angle d'incidence de 5 ° minimise l'influence de la lumière polarisée. Cette lumière provient de la réflexion d'une lumière de longueur d'onde différente à celle de travail et elle est parasite (Di Benedetto, 2007). Ainsi, un polariseur n'est pas nécessaire lorsque l'angle d'incidence est petit, mais est indispensable pour réaliser des mesures de réflectance précises à angles d'incidence élevés (30°, 45°) sans que l'analyse soit influencé par la lumière polarisée (Shimadzu Corporation, 1999a).

Le principe de la réflexion en diffusion (ou diffuse) est le suivant : un faisceau de lumière tombant sur une surface polie plane d'un cristal plus grand que la section du faisceau croisé est partiellement réfléchi de manière spéculaire et partiellement réfracté suivant les lois de la géométrie optique.

Pour les poudres non transparentes, comme l'amidon, les mesures de réflectance se réalisent généralement dans un spectrophotomètre UV visible pourvu d'une sphère d'intégration. Lors de l'analyse, la lumière incidente est réfléchie par l'échantillon et concentrée sur le détecteur en utilisant une sphère ayant à l'intérieur un revêtement de sulfate de baryum (ou autre standard). La valeur obtenue est la réflectance (réflectance relative) par rapport à la réflectance standard de référence, qui est prise à 100%. Lorsque la lumière incidente arrive sur l'échantillon à un angle de 0°, la réflexion spéculaire sort de la sphère d'intégration et n'est donc pas mesurée. Par conséquent, seul le rayonnement de réflexion diffuse est réfléchi vers la sphère d'intégration, et est détecté et intégré dans la mesure (Shimadzu Corporation, 1999a).

La **Figure 22** illustre une vue schématique de l'intérieur de la sphère d'intégration. La lumière à la longueur d'onde choisie entre dans la sphère d'intégration par l'ouverture et est réfléchie par le miroir interne sur l'échantillon. La lumière totale qui est réfléchie, quel que

soit l'angle ou le plan, est « recueillie » par la surface interne hautement réfléchissante de la sphère de telle sorte que la quantité totale de lumière réfléchie par l'échantillon peut être mesurée par le détecteur. La modification de l'angle auquel la lumière incidente touche l'échantillon permet de mesurer la réflectance à la fois diffuse et spéculaire.

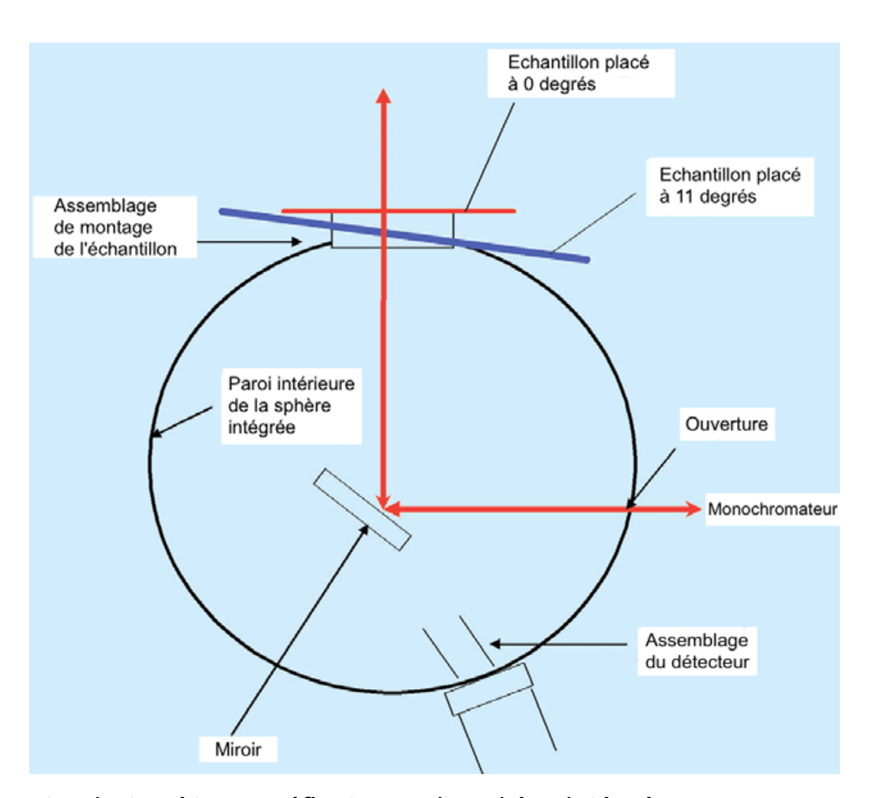


Figure 22. Spectrophotomètre en réflectance de sphère intégrée.

Protocole.

Les analyses des échantillons dans le spectrophotomètre UV-visible ont été effectuées avec un Spectrophotomètre UV-2450 (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) couplé à une sphère intégrée ISR-240A (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) (**Figure 23**) pour la mesure d'échantillons solides, et pourvu d'un système photométrique de double faisceau qui mesure directement le coefficient de réflectance par la méthode de retour par dynode.

La dynode est une électrode d'un tube électronique ou d'un photomultiplicateur, dont le rôle essentiel est de fournir une émission secondaire. Le système de retour permet de mesurer avec précision les absorbances négatives ou les transmittances/réflectances de plus de 100%. L'appareil comprend un monochromateur, présentant les caractéristiques suivantes : aberration (imagerie floue) corrigée par l'assemblage Czerny-Turner et un réseau holographique blazé hautes performances.

L'aberration chromatique est l'écart entre l'image réelle et l'image idéale d'un objet par un système optique parfait (Owen, 1996). Le principe de l'assemblage Czerny-Turner

est que le signal de la fente d'entrée est envoyé par un miroir sur un réseau de diffraction plan (holographique) qui le renvoie sur la fente de sortie par l'intermédiaire d'un deuxième miroir. Un « photomultiplicateur », placé en face de la fente de sortie, mesure la lumière reçue de la sortie (Czerny & Turner, 1930). La fonction de cet assemblage est de réduire le taux d'aberration (Shimadzu Corporation, 1999a).

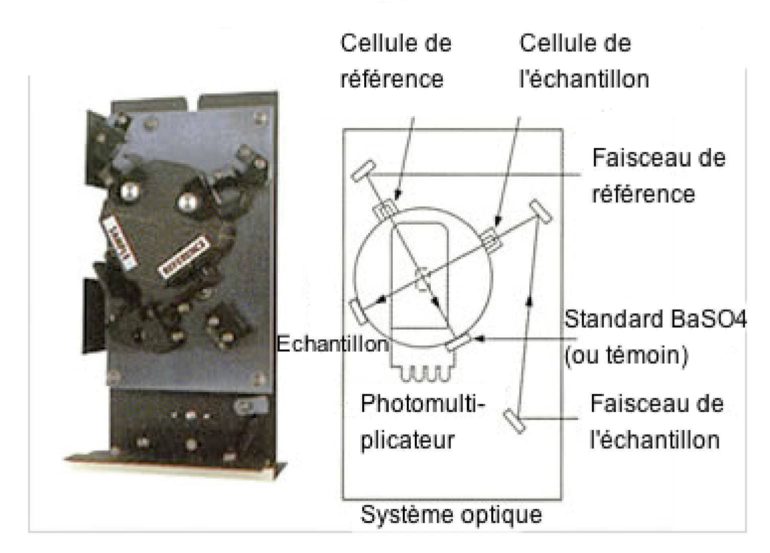


Figure 23. Sphère intégrée assemblée ISR-240 (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) (Shimadzu Corporation, 1999b).

Le principe du réseau holographique blazé est l'utilisation de deux différents angles blazés pour accueillir deux régions de longueur d'onde dans l'infrarouge et le visible. Pour augmenter l'efficacité de réfraction d'un réseau de diffraction par rapport à des longueurs d'onde spécifiques, les faces de rainure en treillis sont fabriquées selon une configuration en dents de scie (blazé). La longueur d'onde de balayage est réalisée en faisant tourner le réseau de diffraction de manière excentrique, en changeant la zone à utiliser sur le réseau de diffraction en fonction de la longueur d'onde (Shimadzu Corporation, 1999a).

La fonction du réseau holographique blazé (Shimadzu Corporation, 1999a) (avec 1600 lignes/mm) est de fournir une énergie optique élevée ayant une aberration minimale (Shimadzu Corporation, 1999a).

Le détecteur est un photomultiplicateur R-928. L'analyse des échantillons a été faite avec une cellule spécifique pour les substrats en état solide. La lecture des expériences a été conduite en réflectance avec une plage de longueur d'onde de 190 à 600 nm. Finalement, les pics d'absorbance obtenus ont été reliés aux énergies de liaison correspondantes. Les échantillons analysés ont été : 13 génotypes du manioc avec les traitements NO, FO et FS. L'échantillon de référence est un amidon de manioc natif, non-modifié.

Pour chaque échantillon 10 mesures ont été effectuées.

3.3.9. Granulométrie.

La fermentation peut réduire le diamètre des granules d'amidon du fait de l'action d'amylases bactériennes (Camargo *et al.*, 1988). L'analyse de la taille des granules d'amidon par diffraction laser a été utilisée pour quantifier ce phénomène.

Principe.

La taille des granules est déterminée à partir de la distribution de tailles, évaluée par diffraction laser. Les particules, éclairées par un faisceau laser focalisé, diffusent la lumière avec un angle inversement proportionnel à leur taille.

La propagation d'un faisceau laser focalisé et ses propriétés de diffraction, suivent les lois spécifiques de l'optique gaussienne, ceci étant dû à la répartition gaussienne de l'intensité dans le plan transverse (perpendiculaire à la propagation) du faisceau (Gérard & Gérard, 1998).

Pour prédire la diffusion d'un faisceau laser par des particules, la théorie de Fraunhofer est appliquée (Chatelet, 1996) :

L'intensité I_j diffractée par N_j particules de diamètre d_j est donnée par la formule suivante (équation mathématique de la tache d'Airy) :

$$I_j(\alpha) = A_j(d_j)V_j\left[\frac{J_1(kd_j \sin\alpha)}{kd_j \sin\alpha}\right]^2 \quad (8)$$

Où : α = angle d'observation ramené dans le plan focal de l'objectif.

$A_j(d_j)$ = coefficient de proportionnalité dépendant de d_j,

V_j = volume occupé par N_j particules.

J_1 = premier ordre de la fonction de Bessel.

$k = 2\pi\ \lambda^{-1}$

L'intensité angulaire de la lumière diffusée est ensuite mesurée par une série de détecteurs photosensibles (**Figure 24**).

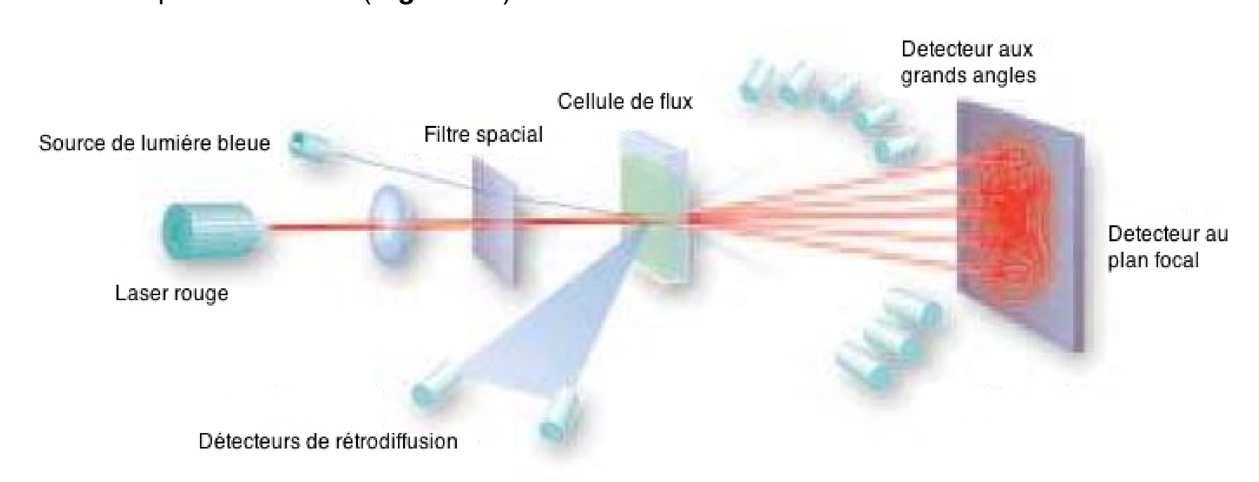


Figure 24. Fonctionnement du granulomètre Mastersizer 2000E en voie liquide (d'après Malvern Instruments (2005)).

Protocole.

L'échantillon est mis en suspension dans l'eau distillée puis il est soumis 30 secondes aux ultrasons, afin de fractionner les amas de granules d'amidon (**Figure 25**) (Jinapong, Suphantharika, & Jamnong, 2008).

Le diamètre moyen des granules d'amidon (D [4,3]) a été déterminé à partir de la distribution de tailles évaluée par diffraction laser sur l'appareil Malvern Mastersizer 2000E (Malvern, Worcestershire, Royaume-Uni). Le taux d'obscuration a été ajusté dans la plage de 11 - 14% pendant les mesures. Le calcul de la taille a été effectué d'après le modèle de Fraunhofer pour les particules non-transparentes. L'indice de réfraction du dispersant (eau) a été fixé à 1,33.

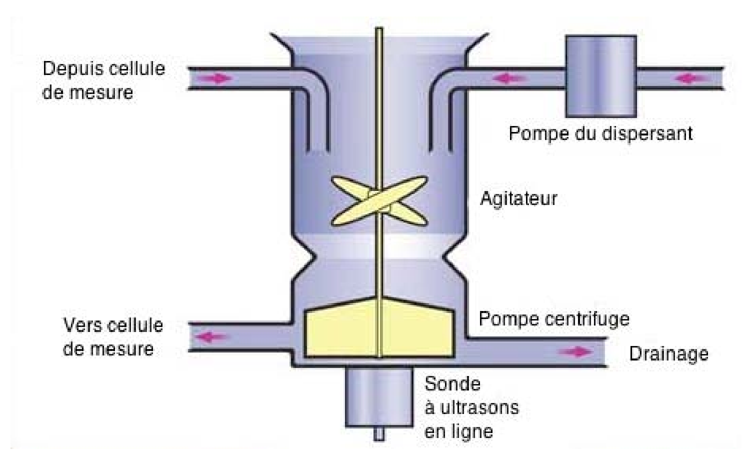


Figure 25. Dispersion de particules en suspension dans le granulomètre (d'après Malvern Instruments (2005)).

Pour chaque échantillon 3 mesures ont été effectuées et les valeurs moyennes ont été calculées.

3.3.10. Analyse rapide de viscosité (RVA).

La fermentation et le séchage solaire modifient les propriétés rhéologiques de l'amidon de manioc, et augmentent la fragilité des granules (Dufour *et al.*, 1995; Mestres *et al.*, 2000). L'analyse rapide de viscosité (RVA) a été utilisée pour quantifier ces changements pour les différents échantillons d'amidons étudiés.

Principe.

Les modifications de la viscosité d'une suspension d'amidon au cours de l'empesage dans des conditions de température et d'agitation contrôlées sont le résultat de plusieurs phénomènes : (1) gonflement granulaire et solubilisation des macromolécules lors de la gélatinisation (BeMiller & Whistler, 2009), (2) dislocation des granules sous l'effet du cisaillement, (3) réassociation des macromolécules lors du refroidissement. La mesure de la viscosité au cours de l'empesage fournit plusieurs informations sur les propriétés

structurelles et fonctionnelles des amidons. Les appareils utilisés communément pour ces analyses sont le viscoamylographe Brabender et l'analyseur rapide de viscosité (RVA) (Thomas & Atwell, 1988) (**Figure 26**).

Le viscoamylographe Brabender était (jusqu'à 1995-1999) traditionnellement utilisé dans le monde entier pour la caractérisation du comportement d'empesage des amidons (Okechukwu & Anandha Rao, 1996). Cet appareil a été remplacé par l'analyseur rapide de viscosité (RVA) (Doublier, Llamas, & Le Meur, 1987), qui présente plusieurs avantages par rapport au viscoamylographe Brabender : des temps d'analyse plus courts (typiquement 10 à 30 min pour le RVA contre 45 à 90 min pour le viscoamylographe), des quantités d'échantillons plus faibles, une efficacité dans le contrôle et la collecte des résultats numérisés et des procédures d'étalonnage facilitées.

Plusieurs travaux ont utilisé le RVA pour des analyses sur la structure fine (Han & Hamaker, 2001) et la teneur en amylose de l'amidon (J. Chen, Lai, & Lii, 2003; Sasaki, Yasui, & Matsuki, 2000).

L'analyse RVA est une méthode rhéologique simple et rapide pour caractériser la suspension amidon-eau lors du chauffage et du refroidissement dans des conditions d'agitation contrôlées (Ross, Walker, Booth, Orth, & Wrigley, 1987; Thomas & Atwell, 1988; Walker *et al.*, 1998). Au début d'un essai, la température est inférieure à la température de gélatinisation de l'amidon, et donc la viscosité est faible. Lorsque la température s'élève au-dessus de la température de gélatinisation, les granules d'amidon absorbent de l'eau et gonflent jusqu'à se toucher et frotter les uns contre les autres. Les forces de cisaillement causées par ce gonflement des granules se traduisent par une augmentation de la viscosité mesurée (Newport Scientific, 2001), qui permet d'analyser les différences entre amidons : taille des granules, diffusion de composés solubles (e.g. amylose) des granules vers la solution.

Protocole.

La méthode reportée par Sánchez *et al.* (2009) a été utilisée. Les profils de viscosité de dispersions d'amidon gélatinisé ont été obtenus avec un analyseur rapide de viscosité modèle RVA-4 Series (Newport Scientific, Warriewood, Australie) (**Figure 26**). L'amidon (1,25 g m.s.) a été dispersé dans l'eau distillée (23 cm^3) pour obtenir une suspension à 5%. La viscosité a été enregistrée selon le profil de température suivant : maintien à 50°C pendant 1 min, chauffage de 50°C à 90°C à une vitesse de 6°C.min^{-1}, maintien à 90°C pendant 5 min, refroidissement à une vitesse de 6°C.min^{-1} jusqu'à 50°C, enfin maintien à 50°C pendant 2 min. Une première agitation à 960 rpm est appliquée pendant les 10 premières secondes, puis à 160 rpm pendant le temps restant de l'expérience. La moyenne sur 2 réplicas a été calculée.



Figure 26. Analyseur rapide de viscosité RVA-4.

Huit paramètres ont été mesurés sur le visco-amylogramme (**Figure 27**) : temps et température d'empesage (respectivement PT et Pt), viscosité du pic 1 (PV1 : premier pic de viscosité consécutif à l'empesage ou pasting), viscosité du pic 2 (PV2 : deuxième pic de viscosité consécutif à l'empesage), temps permettant d'atteindre les pics de viscosité 1 et 2 (tPV1 et tPV2, respectivement), holding strength correspondant à la plus faible viscosité de la pâte chaude (HS) et enfin la viscosité finale (FV).

Cinq paramètres supplémentaires ont été ensuite calculés : la capacité de cuisson (CA) estimée par (tPV2 – Pt), le « breakdown » (BD) estimé par (PV2-HS), le « relative breakdown » (RBD) déterminé par (BD/PV2) x 100, le « set-back » (SB) estimé par (FV – HS) et le « relative set-back » (RSB) estimé par (SB/FV) x 100.

Interprétation des paramètres de la courbe de viscosité.

« *Pasting temperature* » ou température d'empesage de l'amidon : ce paramètre marque l'augmentation initiale de la viscosité (Limpisut & Jindal, 2002). C'est la température pour laquelle les granules d'amidon commencent à gonfler, perdant leur cristallinité (disparition de la croix de polarisation) et démarrant la viscosité du milieu de cuisson. Lorsque les granules d'amidon en suspension avec de l'eau sont chauffés, l'eau s'introduit dans le granule pour l'hydrater et provoque le gonflement. Lors de cette étape, les polymères ayant un faible poids moléculaire, surtout l'amylose, commencent à « lixivier » hors des granules (Thomas & Atwell, 1988).

Dans cette étude, la pasting temperature a été définie comme la température à laquelle la différence entre la viscosité mesurée et la ligne de base devient supérieure à 20 cP pour la première fois.

Ce paramètre est un indicateur de la température minimale nécessaire pour cuire un échantillon donné, et du coût énergétique qui y est lié (Shimelis, Meaza, & Rakshit, 2006).

« *Peak viscosity* » ou viscosité maximale : Ce paramètre indique le point auquel les amidons atteignent la viscosité maximale au cours de la gélatinisation (Limpisut & Jindal, 2002; Thomas & Atwell, 1988). Ce paramètre peut aussi servir d'indicateur de la capacité d'absorption d'eau et de gonflement des granules qui sont corrélés à la qualité du produit final (Onitilo *et al.*, 2007; Shimelis *et al.*, 2006). Lorsque la température augmente, les granules gonflent augmentant la viscosité de la pâte jusqu'à atteindre le pic de viscosité maximal (Adeyemi & Beckley, 1986). Dans le cas des amidons de manioc, deux pics de viscosité successifs sont souvent observés (Escobar *et al.*, 2009).

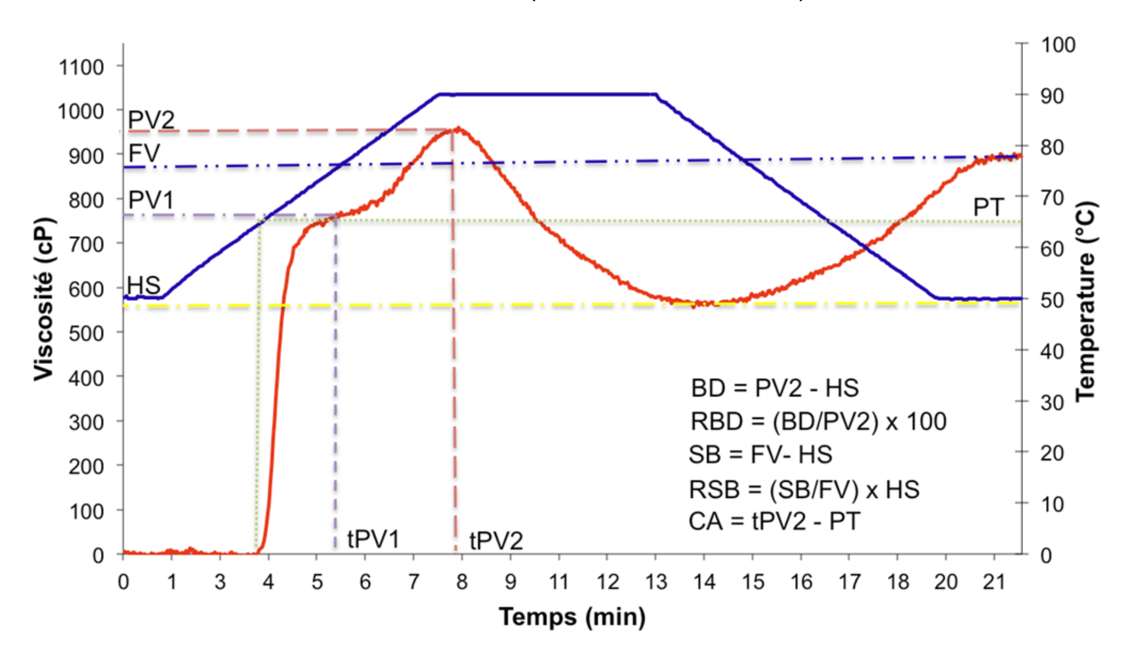


Figure 27. Viscoamylogramme et paramètres de viscosité associés d'un échantillon d'amidon de manioc.

« *Breakdown* » : Le breakdown indique la chute de viscosité en fin de cuisson, (Limpisut & Jindal, 2002), et reflète l'affaiblissement de la structure des granules d'amidon après leur gonflement au cours de la gélatinisation (Krishna Kumari & Thayumanavan, 1998 cité par Lawal, 2004). Un breakdown élevé est lié à une faible capacité des échantillons à résister aux contraintes de cisaillement (Akanbi, Ade Omowaye, Ojo, & Adeyemi, 2003; Erdogan & Gurses, 2005).

Pour comparer des amidons très différents par leur viscosité, le **relative breakdown** peut apporter des informations complémentaires au breakdown, en normalisant le breakdown par le pic de viscosité :

$$\text{Relative breakdown (\%)} = \text{Breakdown / Pic de viscosité maximale} \times 100 \qquad (9)$$

« *Setback* » : La setback est un indicateur de la rétrogradation de l'amylose (Betancur, Ancona, Guerrero, Camelo Matos, & Ortiz, 2001), c'est-à-dire la réassociation des

molécules d’amylose sous forme de doubles hélices lors de la phase de refroidissement d’une analyse viscosimétrique (Thomas & Atwell, 1988). Quelques travaux ont montré que ce phénomène est corrélé positivement avec la teneur en amylose, la longueur de ses chaînes et leur état de dispersion (Mishra & Rai, 2006; Thomas & Atwell, 1988).

Comme pour le relative breakdown, la **relative setback** peut apporter des informations complémentaires à la setback dans le cas d’amidons très différents par leur viscosité :

$$\text{Relative setback (\%)} = \text{Setback} / \textit{Final viscosity} \times 100 \qquad (10)$$

« *Final viscosity* » : c’est le paramètre le plus communément utilisé pour caractériser la capacité d’un matériel à gélifier après cuisson (Onitilo *et al.*, 2007; Osungbaro, Jimoh, & Osundeyi, 2012; Shimelis *et al.*, 2006). La viscosité finale est déterminée d’une part par l’augmentation de la viscosité de la solution due à la baisse de la température, et d’autre part par d’éventuelles réassociations moléculaires, telles que la rétrogradation de l’amylose ou la formation de complexes amylose-lipide (dans le cas où des lipides sont présents dans l’échantillon). La viscosité finale indique la stabilité de la pâte cuite, autrement dit la stabilité du gel après refroidissement (Shimelis *et al.*, 2006).

3.3.11. Viscosité intrinsèque.

La fermentation et le séchage solaire entraînent une réduction de la masse moléculaire de l’amidon aigre de manioc (Bertolini *et al.*, 2000; Marcon *et al.*, 2009). La viscosité intrinsèque a été mesurée pour quantifier cette réduction.

Principe.

La viscosité intrinsèque est une mesure de la friction interne, ou de la résistance au mouvement, des molécules des polymères en solution. La friction interne est la contrainte de cisaillement ou la force de frottement entre les molécules des polymères en solution. Si la concentration des molécules de polymères est élevée cela signifie que la friction interne dans la solution est élevée, avec pour résultat une viscosité intrinsèque $[\eta]$ élevée (Chan, Bhat, & Karim, 2009).

La viscosité intrinsèque d’un polymère en solution est la valeur limite de l’indice de viscosité (viscosités réduite et inhérente) à contrainte de cisaillement nulle (dilution infinie). Pour de nombreux polymères, il y a des conditions d’approximation simplifiant les mesures des viscosités réduite et inhérente (Harding, 1997).

Mesure de la viscosité.

La viscosité intrinsèque peut être mesurée par des viscosimètres d'écoulement capillaire, des viscosimètres de type orifice, des viscosimètres à chute de billes, et des viscosimètres à rotation (Sahin & Gülüm Sumnu, 2006).

Le viscosimètre capillaire ou viscosimètre d'« Ostwald » est le dispositif le plus utilisé. Cet appareil est pourvu d'une pièce de verrerie placée verticalement dans un environnement à température constante, par exemple un bain-marie thermostaté. Le principe est de mesurer le temps d'écoulement d'un volume de liquide (une solution de polymère ou un solvant) à travers le capillaire. Cette mesure est effectuée pour le solvant, puis pour la solution à différentes concentrations (Harding, 1997).

Pour les hydrocolloïdes agroalimentaires tel que l'amidon, les mesures de viscosité intrinsèque, exprimées en $mL.g^{-1}$, sont réalisées en faisant s'écouler des solutions à différentes concentrations dans des viscosimètres à tube capillaire, de type Ubbelohde, thermostatés (typiquement 25°C). Divers solvants peuvent être utilisés selon le polymère étudié (hydroxyde de potassium, dimethyle sulfoxyde, etc) (Harding, 1997). L'avantage de cet appareil est que les mesures sont indépendantes de la quantité de solution (volume total) dans le viscosimètre. Des dilutions progressives peuvent donc être préparées directement dans le viscosimètre (Harding, 1997).

La viscosité intrinsèque extrapolée à contrainte de cisaillement nulle est reliée à la masse molaire *M* (en g/mol) par la relation empirique de Mark-Houwink Sakurada :

$$[\eta]_0 = KM^{\alpha} \qquad (11)$$

Où : *K* et *α* sont constantes qui ne dépendent que de la nature du polymère et du solvant, et de la température.
Les valeurs d'*α* sont comprises entre 0,5 et 0,8 pour les polymères flexibles, et entre 1,00 et 1,81 pour les polymères rigides.

Pour les macromolécules flexibles, la relation précise entre $[\eta]_0$ et *M* peut s'écrire :

$$[\eta]_0 = 6^{3/2} \phi R_g^3 / M \qquad (12)$$

Où : $\Phi = 2{,}5 \times 10^{23}$ constante universelle (sans dimension) : la constante de Flory,
R_g (cm) rayon de giration de la macromolécule.

Protocole.

Une solution à 3% d'amidon (m.s.) a été préparée par dissolution de l'amidon dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 5 mol/L). Cette solution a été chauffée dans un bain thermostaté à 95°C pendant 10 min. Puis les échantillons ont été maintenus sous agitation magnétique pendant 20 heures (± 10 min) dans une pièce à température contrôlée à 22°C (± 0,5°C). La solution résultante a été centrifugée à 10000 rpm pendant 5 min. Le surnageant (2 mL) a été prélevé et dilué dans 28 mL d'eau distillée pour réduire la concentration de KOH à 0,33 mol/L, et la concentration d'amidon à 2 mg/mL. La solution diluée a été filtrée à travers un filtre à seringue (diamètre des pores 0,45 µm). 10 mL de la

solution filtrée ont été recueillis pour réaliser une dilution en série avec de l'eau distillée (**Tableau 11**). Les concentrations obtenues sont les suivantes : 2,0 ; 1,7 ; 1,4 ; 1,1 et 0,8 mg d'amidon / mL.

Les mesures ont été réalisées avec un viscosimètre Ubbelohde (tube en U, taille 2 mL, Shott Geräte GmbH, Hofheim, Allemagne) maintenu dans un bain thermostaté à 35°C (cf. **Figure 28**). Pour chaque dilution, après une période de 10 min d'équilibration thermique, le temps d'écoulement de la solution dans le viscosimètre a été enregistré trois fois. Des tests préliminaires ont montré une bonne répétabilité de la mesure des temps d'écoulement.

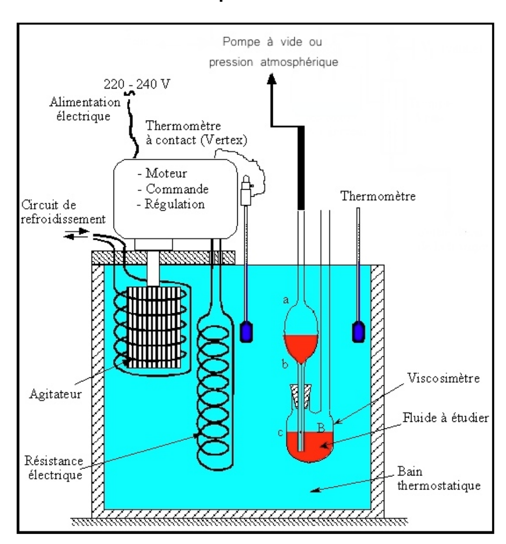


Figure 28. Viscosimètre Ubbelohde pour la mesure de la viscosité intrinsèque.

Les viscosités réduite (η_{red}) et inhérente (η_{inh}) ont été calculées comme suit, pour chaque dilution (Harding, 1997) :

$$\eta_{red} = ((t/to)-1)/C \quad (13)$$

$$\eta_{inh} = (ln\ (t/to))/C \quad (14)$$

Où : *t* = temps d'écoulement de la solution (s)

to = temps d'écoulement du KOH 0,33 mol/L (s)

C = concentration de la solution (mg/mL)

Les équations utilisent *t/to* au lieu de η/η_o car les temps d'écoulement de la solution et du solvant que l'on mesure sont proportionnels à leurs viscosités.

La viscosité réduite représente le rapport de la viscosité relative sur la concentration de la solution de l'amidon. La viscosité inhérente représente le rapport du logarithme népérien de la viscosité relative sur la concentration de la solution de l'amidon. La viscosité relative est le rapport de la viscosité de la solution sur la viscosité du solvant.

Les viscosités réduite et inhérente ont été extrapolées à concentration zéro à partir de régressions linéaires sur le graphe représentant ces viscosités en fonction de la

concentration (Harding, 1997). Finalement, la viscosité intrinsèque a été calculée comme la moyenne des viscosités réduite et inhérente extrapolées à concentration zéro. La **Figure 29** montre le point d'intersection entre la viscosité réduite et inhérente à concentration zéro qui définit la viscosité intrinsèque.

3.3.12. Porosité.

Une hypothèse concernant l'effet de la fermentation sur la structure des granules est que la porosité augmente suite à l'hydrolyse d'une partie des molécules d'amidon (Camargo *et al.*, 1988; Dufour *et al.*, 1995). Des analyses de porosité à l'hélium et au mercure pour la détection des porosités fermées et ouvertes, respectivement, ont été effectuées afin de vérifier cette hypothèse et quantifier les éventuelles différences de porosité entre variétés de manioc.

La porosité et sa distribution affectent d'une part les propriétés mécaniques des aliments (Sahin & Gülüm Sumnu, 2006) et d'autre part, les propriétés de transport comme la diffusivité des molécules au sein des matériaux alimentaires (Marousis, Karathanos, & Saravacos, 1991; Marousis, 1989).

La porosité est une des caractéristiques importantes des granules d'amidon (Sujka & Jamroz, 2007) qui peut influencer sa réactivité (Huber & BeMiller, 2000).

Définition de porosité.

La porosité (ε) est définie comme l'espace occupé par les pores contenus dans un matériau donné (Sing *et al.*, 1985).

La porosité de granules d'amidon est définie comme le rapport du volume des vides sur le volume total des granules de l'échantillon (Juszczak, Fortuna, & Wodnicka, 2002a; Sahin & Gülüm Sumnu, 2006; Sujka & Jamroz, 2007) :

$$Porosité(\varepsilon) = \frac{Volume\ vide}{Volume\ total} \tag{15}$$

Porosité intragranulaire.

La porosité intragranulaire est la porosité comprise à l'intérieur du granule d'amidon. Elle est la résultante de deux types de pores : les pores ouverts et les pores fermés (cf. **Figure 30**) (Juszczak *et al.*, 2002a; Sahin & Gülüm Sumnu, 2006; Sing *et al.*, 1985; Sujka & Jamroz, 2007).

$$\varepsilon_i = \varepsilon_{PO} + \varepsilon_{PF} \tag{16}$$

Où : ε_i = porosité intragranulaire

ε_{PO} = porosité ouverte

ε_{PF} = porosité fermée.

Tableau 11

Dilutions en série de solutions d'amidon pour l'analyse de la viscosité intrinsèque.

Dilutions	Volume prélevé pour la mesure (mL)	Masse minimale nécessaire de l'amidon (mg)	Masse d'amidon dans la solution initiale (mg)	Volume restant de la solution initiale (mL)	Volume ajouté de KOH (0,33 mol/L) (mL)	Volume final (mL)	Concentration finale en amidon (mg/L)
1	2,0	4,0	20,0	10,00	0,00	10,00	2,0
2	2,0	3,4	16,0	8,00	1,41	9,41	1,7
3	2,0	2,8	12,6	7,41	1,59	9,00	1,4
4	2,0	2,2	9,8	7,00	1,91	8,91	1,1
5	2,0	1,6	7,6	6,91	2,59	9,50	0,8

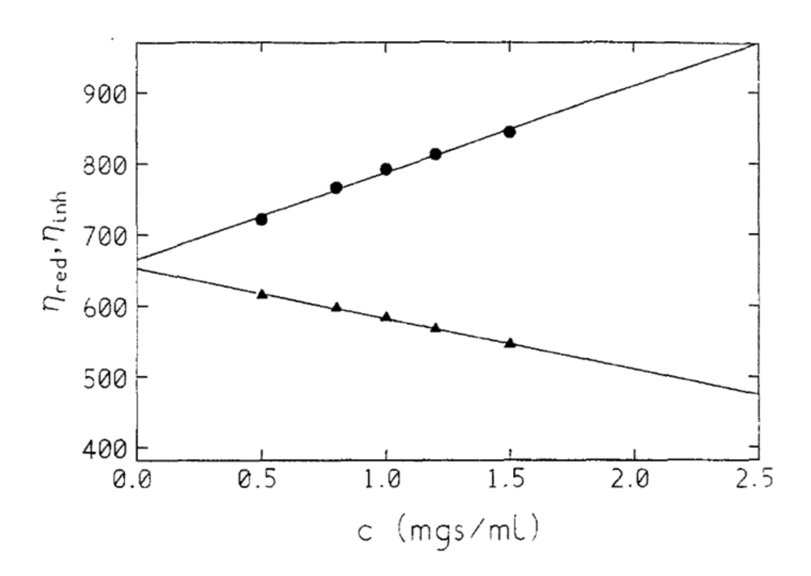


Figure 29. Viscosité réduite (η_{red}) viscosité inhérente (η_{inh}) versus concentration extrapolées à concentration zéro (D'après Harding (1997)).

Pores ouverts.

Les pores ouverts sont les canaux ou cavités qui communiquent avec la surface du granule (Sing *et al.*, 1985). Le volume, la forme et la taille des pores ouverts sont le résultat de l'intensité et du type de processus qui se sont produits à la surface des granules du fait des traitements appliqués post-récolte (extraction d'amidon, fermentation, séchage, etc.) (Juszczak *et al.*, 2002a).

Pores fermés.

Les pores fermés sont des espaces situés à l'intérieur du granule et qui ne sont pas connectés à sa surface externe (Sing *et al.*, 1985). La présence de pores fermés influence la densité du produit et ses propriétés mécaniques et thermiques (Juszczak *et al.*, 2002a).

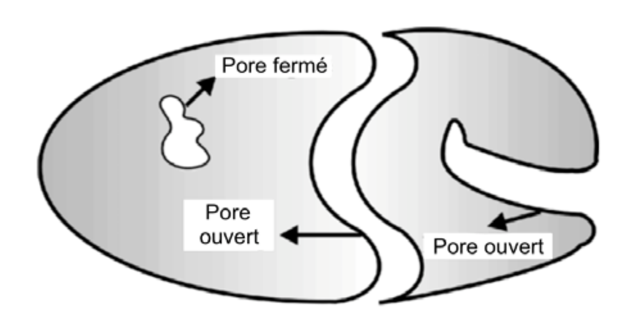


Figure 30. Différents types de porosité apparente (porosité intra granulaire) (D'après Sahin & Gülüm Sumnu (2006))

Taille des pores.

La classification des pores est basée sur leur diamètre (ø) (Meyer, Lorenz, Böhl-Kuhn, & Klobes, 1994; Paderewski, 1999; Sujka & Jamroz, 2007). Ainsi, d'après l'IUPAC (Sing *et al.*, 1985) les pores sont des macropores si leur diamètre est supérieur à 50 nm, des mésopores pour des diamètres situés entre 2 et 50 nm et des micropores pour des diamètres inférieurs à 2 nm.

Forme des pores.

La forme des pores peut être très variable : simples canaux cylindriques, fissures et formes de cône ou de bouteille. Les pores des granules d'amidon diffèrent en fonction de leur origine. Par exemple, les granules natifs du manioc semblent ne pas avoir de pores tandis que ceux de l'amidon de pomme de terre présentent des pores de surface (Fannon, Hauber, & Bemiller, 1992).

Origine des pores.

Les pores peuvent apparaître lors de la formation des granules ou pendant certains procédés post-récolte (Fannon *et al.*, 1992).

Le **Tableau 12** résume leurs origines possibles :

Tableau 12. Les différentes origines des pores.

Lors de la formation des granules.
i) Origine naturelle, ils sont caractéristiques de la structure du granule. [a]
ii) Provoqués par des procédés naturels prenant place dans le tissu de la plante.
Après la formation du granule. [b]
iii) Issus du traitement mécanique des granules. [b]
iv) Conséquences des traitements de séchage. [a]
v) Résultats de procédés thermiques ou hydrothermiques. [c]
vi) Formés pendant l'isolation ou pendant la préparation de l'échantillon lors d'une observation par microscopie électronique. [d]
vii) Produits par action des amylases *in situ* ou des amylases produites lors du broyage par voie humide. [a]

[a] (Fannon *et al.*, 1992)
[b] (Niemann & Whistler, 1992)
[c] (Baldwin, Adler, Davies, & Melia, 1994)
[d] (Sujka & Jamroz, 2007)

Modification de la porosité du granule d'amidon de manioc par l'action des amylases.

La porosité de l'amidon peut être modifiée par les traitements physiques, chimiques et enzymatiques (Sujka & Jamroz, 2007). Les granules d'amidon de manioc natifs sont dépourvus de pores (Fannon *et al.*, 1992). Néanmoins, le traitement de fermentation peut provoquer des perforations dans les granules dues à l'action des enzymes amylolytiques des bactéries lactiques, qui attaquent plus facilement les zones amorphes que les zones cristallines (Marcon *et al.*, 2007; Mestres *et al.*, 2000; Mestres & Rouau, 1997).

Méthodes de détermination de la porosité des amidons.

Parmi les principales méthodes d'évaluation de la porosité des matériaux amylacés (**Tableau 13)**, nous en retenons deux : la porosité au mercure et la porosité à l'hélium. Ces méthodes utilisent porosimètres et pycnomètres, respectivement pour analyser la porosité (Karathanos & Saravacos, 1993; Sahin & Gülüm Sumnu, 2006).

La porosité à l'hélium permet de déterminer le volume des pores fermés tandis que la porosité au mercure donne accès au volume des pores ouverts. La complémentarité de ces deux méthodes donne la porosité totale (porosité intragranulaire ouverte et fermée) (cf. **Figure 31**).

Ces analyses permettront de détecter les éventuels changements dus à la fermentation au niveau de la porosité fermée et de la porosité ouverte (Juszczak *et al.*, 2002a; Sujka & Jamroz, 2007), et ainsi de démontrer ou non l'augmentation de la porosité dans le granule lors du traitement de fermentation.

Tableau 13

Méthodes pour examiner la porosité de l'amidon.

Microscopie électronique à balayage (MEB) [abcdefghi]
Microscopie électronique en transmission (MET) [j]
Microscopie à force atomique (AFM) [kd]
Porosité au mercure [kl]
Porosité à l'hélium [mno]
Méthodes basées sur l'adsorption physique à partir des phases gazeuse ou liquide [p]

[a] (Fannon *et al.*, 1992)
[b] (Fannon, Shull, & Bemiller, 1993)
[c] (Fortuna, Juszczak, Kujawski, & Palasinski, 2000)
[d] (Helbert, Schülein, & Henrissat, 1996)
[e] (Huber & BeMiller, 2000)
[f] (J. H. Li, Vasanthan, Hoover, & Rossnagel, 2004)
[g] (Planchot *et al.*, 1995)
[h] (Sarikaya, Higasa, Adachi, & Mikami, 2000)
[i] (Baldwin, Davies, & Melia, 1997)
[j] (Szymońska, Krok, Komorowska-Czepirska, & Rębilas, 2003)
[k] (Thomson, Miles, Ring, Shewry, & Tatham, 1994)
[l] (Karathanos & Saravacos, 1993)
[m] (Jamroz, Hajnos, & Sokolowska, 1999)
[n] (Marousis & Saravacos, 1990)
[o] (Juszczak *et al.*, 2002a)
[p] (Juszczak, Fortuna, & Wodnicka, 2002b)

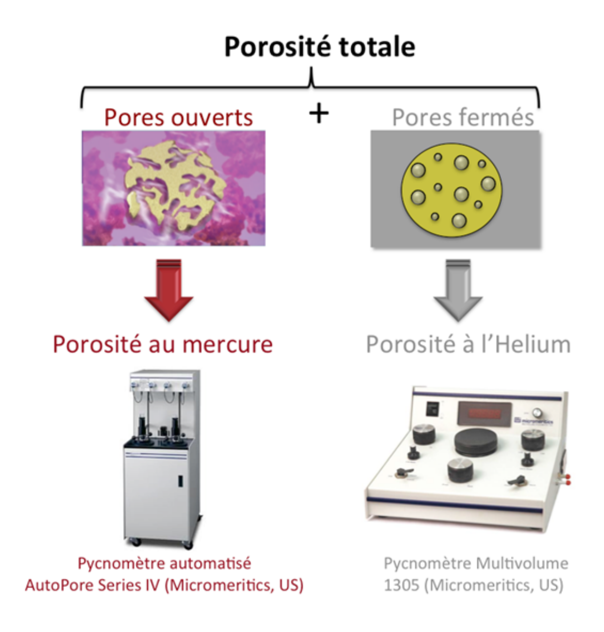


Figure 31. **Schéma des méthodes de porosité dans l'amidon**

3.3.12.1. Porosité à l'Hélium.

Principe.

La mesure de la densité particulaire et de la densité vraie peut être réalisée à l'aide d'un pycnomètre à hélium. L'hélium est une petite molécule qui peut pénétrer dans les pores ouverts d'un matériau poreux ou d'une poudre dont la taille des pores est supérieure à 0,25 nm. Sous pression, l'hélium va pénétrer ainsi dans la porosité fermée et permettra la détermination du volume particulaire et le calcul de la densité particulaire connaissant la masse exacte de solide introduite. Le volume particulaire est constitué du volume vrai de la matière solide additionné de la porosité fermée. La détermination du volume vrai peut être réalisée après micronisation des particules.

Le principe de la mesure est basé sur l'équation des gaz parfaits :

$$PV = nRT \quad (17)$$

Où : P = pression du gaz (Pa),
V = volume occupé par le gaz (m^3),
n = nombre de moles de gaz,
R = constante universelle des gaz parfaits (R = 8,314472 $J.K^{-1}.mol^{-1}$) et
T = température (K).

La cellule contenant l'échantillon (**Figure 32**) (cellule de mesure de volume connu) est en communication avec une chambre d'expansion de volume également calibré et connu. Une certaine pression d'hélium est introduite dans la cellule de mesure où l'hélium occupe tout le volume libre de solide, y compris la porosité fermée du solide qui lui est accessible. La cellule contenant l'échantillon et la chambre d'expansion sont mises en communication et la pression est mesurée après expansion. Le volume particulaire de l'échantillon est calculé sur la base de la mesure de la variation de pression provoquée par la détente du gaz (Micromeritics, 2001a).

L'utilisation de l'hélium pour la détermination de la porosité a l'avantage de ne pas déformer l'échantillon et de respecter sa porosité initiale : les molécules sont très petites et peuvent pénétrer rapidement les petits pores de l'amidon (Dandekar, 2010).

L'objectif de l'étude est de vérifier l'hypothèse que la porosité des granules d'amidon augmente après fermentation. Si cette hypothèse est vérifiée, la porosité fermée des échantillons fermentés va être plus élevée que celle des amidons natifs.

Protocole.

Le protocole de mesure est basé sur Fang & Campbell (2000) :

Une prise d'essai de 10 g d'amidon est placée dans la cellule de mesure de taille moyenne (de 4 à 31 cm^3 pour les poudres) dans le porosimètre. La cellule contenant

l'échantillon est d'abord pressurisée avec l'hélium (pression *P1*). Ensuite, la valve d'expansion est ouverte, entrainant la libération de l'hélium vers la chambre d'expansion et remplissant à la fois la chambre de l'échantillon et la chambre d'expansion. En conséquence, la pression relative de la chambre de l'échantillon diminue (pression *P2*). Pour les calculs de densité on utilise les deux pressions obtenues, à partir de l'équation suivante, basée sur la loi des gaz parfaits :

$$Vé = Vc - \frac{V\exp}{\left(\frac{P2}{P1} - 1\right)} \quad (18)$$

Où : *Vé* = volume particulaire de l'échantillon (cm^3)

Vc = volume de la cellule de mesure (cm^3)

Vexp = volume de la chambre d'expansion (cm^3)

P1 = Pression imposée dans la chambre de l'échantillon (Pa)

P2 = Pression dans la chambre de l'échantillon et la chambre d'expansion après ouverture de la valve d'expansion (Pa).

Vc et *Vexp* sont des constantes de l'appareil. *Vc* = 36,293 cm^3 et *Vexp* = 20,731 cm^3 selon les données du rapport de calibration pour la cellule de mesure. Le coefficient de variation de la mesure a été estimé à 2,4%.

Connaissant *Vé* et la masse d'échantillon d'amidon (*m*), la densité particulaire (*ρs*) est calculée par :

$$\rho s = \frac{m}{Vé} \quad (19)$$

La **Figure 32** illustre le schéma du pycnomètre à l'hélium.

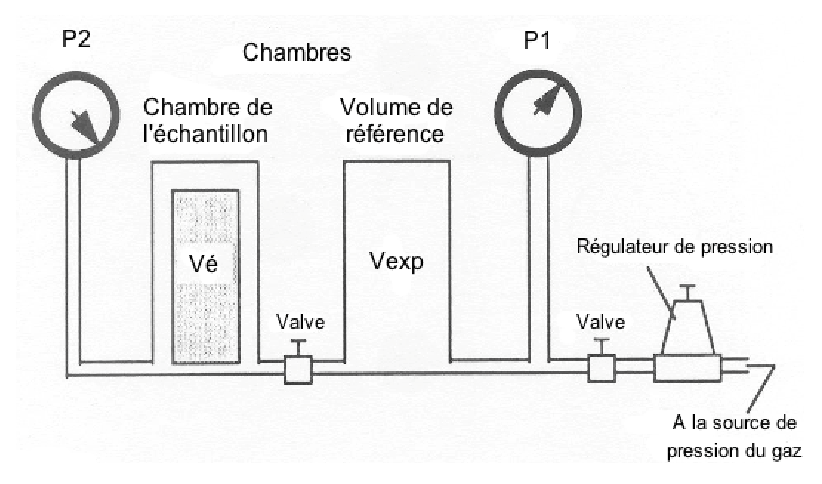


Figure 32. Schéma du pycnomètre à l'hélium.

3.3.12.2. Porosité au Mercure.

Principe.

La porosimétrie au mercure utilise l'équation de Washburn (Washburn, 1921) pour décrire l'intrusion de mercure dans un matériau poreux en fonction de la pression appliquée sur le mercure. Le mercure est utilisé parce qu'il est non mouillant (angle de contact d'environ 130°) et non réactif pour la plupart des surfaces solides. Sous pression atmosphérique, de par son angle de contact supérieur à 90°, il ne pénètre donc pas la porosité ouverte du solide. Il est donc nécessaire d'appliquer une pression pour qu'il puisse pénétrer dans la porosité du matériau.

L'équation de Washburn est la suivante :

$$D = \frac{-4\sigma \cos\theta}{P} \tag{20}$$

Où : D = *le* diamètre équivalent de pores (µm)

P = la pression d'intrusion (Pa)

θ = l'angle de contact entre le mercure et la phase solide

σ = la tension superficielle air-mercure (dyn/cm)

La pénétration du mercure dans les pores des échantillons est assurée par des incréments de pression, permettant pour chacun d'entre eux, d'atteindre une porosité d'autant plus fine (cf. **Figure 33**). La pression du mercure est inversement proportionnelle à la taille des pores. Une pression faible est requise pour rentrer dans les macropores tandis qu'une pression beaucoup plus importante est nécessaire pour accéder aux mésopores (Micromeritics, 2001b). En fonction des incréments de pression, la distribution de taille des pores ouverts d'un matériau poreux peut ainsi être établie.

Cette méthode rencontre une limite pour les matériaux organiques, beaucoup plus fragiles que les matériaux minéraux. En effet, sous l'effet de la pression de mercure, les matériaux organiques peuvent être amenés à se déformer (écrasement) ou au contraire à éclater si la pression de mercure dans les pores devient trop importante.

De plus, dans le cas de la mesure de la porosité d'un lit de poudre (ce qui est le cas de cette analyse), le mercure pénètre sous faible pression, d'abord la porosité du lit, plus large et accessible. C'est seulement sous des pressions beaucoup plus élevées que le mercure pénètre réellement la porosité située dans le granule d'amidon. C'est celle qui nous intéresse dans ce travail. Nous la situons, vu la taille des granules d'amidon, à des dimensions inférieures à 1 µm.

Cette méthode vient en complément de la méthode de mesure réalisée au pycnomètre à Hélium, elle est utilisée pour apprécier l'effet de la fermentation sur la structure du granule d'amidon, l'objectif étant de démontrer que la porosité augmente après

fermentation. Dans notre analyse, le mercure permet de déterminer la distribution de taille des pores.

Protocole.

La porosité au mercure a été déterminée avec un porosimètre automatique au mercure AutoPore IV 9500 (Micromeritics). Un traitement préalable a été réalisé pour les échantillons afin d'éliminer les matières adsorbées qui pourraient masquer la porosité accessible.

La porosité a été déterminée comme dans la littérature (Alshebani *et al.*, 2008; Micromeritics, 2001b; Shafer & Neasham, 2000)**.** Une prise d'essai de 0,5 g d'amidon a été placée dans la cellule de mesure en verre appelée « pénétromètre ». L'induction au dégazage au vide du système poral de l'échantillon (max 7 Pa) a été appliquée, ensuite l'échantillon a été recouvert de mercure et a été soumis à des séries de basse pression. Le pénétromètre rempli de mercure a été transféré dans l'unité de l'appareil destinée aux pressions élevées, atteignant un maximum de 414 MPa. La **Figure 33** illustre le mécanisme de mesure du porosimètre au mercure qui utilise l'équation de Washburn pour décrire l'intrusion du mercure dans un matériel poreux comme une fonction de la pression appliquée au mercure. La somme des pores inférieurs à 1 µm a été considérée pour vérifier la différence de porosité entre les traitements. Le choix a été effectué d'après les diagrammes de porosité des échantillons de cette étude. Par conséquent, cette taille de porosité est attribuée à la porosité intragranulaire.

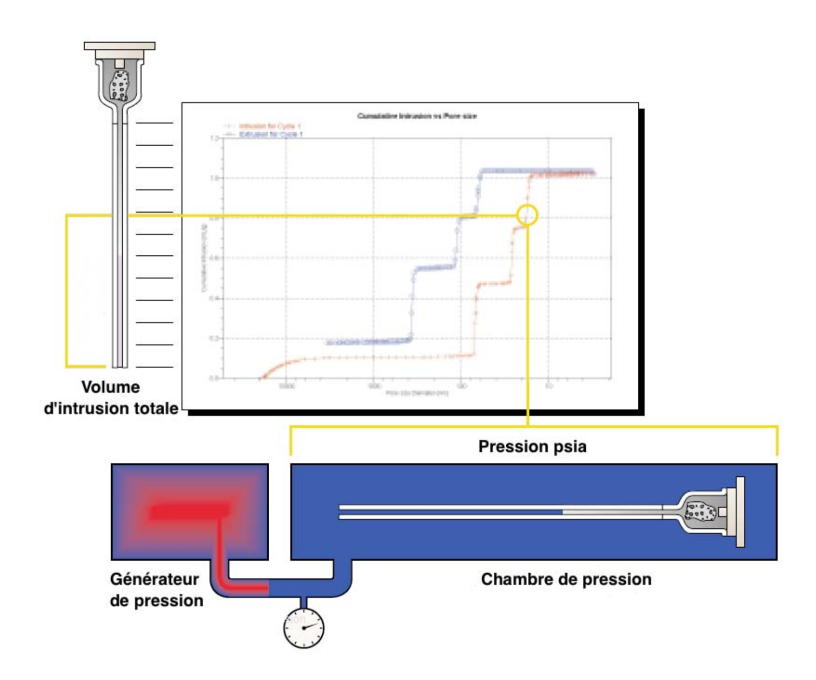


Figure 33. Mécanisme de mesure du porosimètre au mercure (Micromeritics, 2001b).

3.3.13. Digestibilité enzymatique.

La fermentation endommage la structure des granules d'amidon (Camargo *et al.*, 1988), d'où l'hypothèse que leur sensibilité à l'hydrolyse (ou digestiblité) enzymatique augmente après fermentation du fait de la diffusion plus facile des enzymes vers les parties internes des granules. Des expériences de digestibilité enzymatique ont été conduites pour vérifier cette hypothèse, et pour vérifier si la variété d'amidon influe sur la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique.

Principe.

La digestion enzymatique provoque l'hydrolyse de l'amidon, sous l'action d'enzymes amylolytiques aboutissant à des produits de poids moléculaire réduit par rapport aux molécules d'amidon natives (Miyazaki *et al.*, 2006). Les enzymes amylolytiques agissent selon deux mécanismes différents sur le granule d'amidon : i) par exocorrosion, les enzymes se positionnent sur la surface du granule, dégradant ainsi sa partie externe et ii) par endocorrosion, les enzymes pénètrent le granule par de petits pores puis corrodent sa partie interne (Gallant, Derrien, Aumaitre, & Guilbot, 1973; Gallant, Mercier, & Guilbot, 1972; Oates, 1997).

Une des plus importantes enzymes amylolytiques est l' α-amylase (Sujka & Jamroz, 2007). L'α-amylase (1,4 α-D glucan glucanohydrolase, EC3.2.1.1) catalyse l'hydrolyse (endo-corrosion) des liaisons α-1,4-D-glucosidique. Les points de branchement qui contiennent les liaisons α-1,6-D-glucosidique ne sont pas concernés par cette attaque (Bryjak, 1999; Hoover & Zhou, 2003).

L'α-amylase pancréatique (l'AP) est une enzyme efficace et couramment utilisée (Kimura & Robyt, 1995; Valetudie, Colonna, Bouchet, & Gallant, 1993), et produit principalement du maltose, de la maltotriose et de la maltotétraose (Robyt 1984). Valetudie *et al.* (1993) ont montré que cette enzyme provoque une dégradation d'endo et d'exocorrosion.

La sensibilité des amidons natifs à l'α-amylase diffère selon l'origine botanique, la structure du granule (Valetudie *et al.*, 1993) et le type d'amylase (Fuwa, Takaya, & Sugimoto, 1980). En règle générale, les amidons de céréales sont plus sensibles à l'hydrolyse enzymatique que les amidons provenant des tubercules et des racines (Fuwa *et al.*, 1980; Rasper, Rasper, & Mabey, 1974). Parmi les tubercules tropicaux, la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique diffère également selon l'origine botanique (Gallant *et al.*, 1982). L'amidon de pomme de terre est considéré comme un des amidons les moins sensibles à l'hydrolyse enzymatique (Rasper *et al.*, 1974; Rickard, Asaoka, & Blanshard, 1991; Rocha, Carneiro, & Franco, 2010; Valetudie *et al.*, 1993). Par ailleurs, l'amidon de manioc, plus sensible que d'autres tubercules (Rickard *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 2010; Valetudie *et al.*,

1993), présente une sensibilité similaire aux céréales (Uthumporn, Zaidul, & Karim, 2010; Valetudie *et al.*, 1993).

L'amidon de manioc peut être attaqué par endo ou exo-corrosion par action de l'α-amylase. D'après Oates (1997), l'α-amylolyse des amidons de manioc se produit par endocorrosion dans des zones spécifiques de la surface du granule (« piqûres »). Ces piqûres s'élargissent au cours de l'hydrolyse et créent de larges canaux d'endocorrosion qui s'enfoncent à l'intérieur du granule. En revanche, deux études indiquent que la dégradation peut être causée également par exocorrosion. En effet, Franco *et al.* (1988) ont démontré que l'α-amylase bactérienne provoque une forte dégradation superficielle du granule et une faible corrosion radiale. Par ailleurs, Valetudie, Colonna, Bouchet, & Gallant (1993) ont démontré que les α-amylases bactérienne et pancréatique peuvent dégrader toute la surface du granule.

L'analyse de digestibilité enzymatique permet d'étudier la morphologie et la structure du granule d'amidon (Franco *et al.*, 1988; Gallant *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 2010; Sujka & Jamroz, 2007), en fournissant des informations sur les zones du granule sensibles à l'hydrolyse. Par exemple, cette méthode permet de déterminer la sensibilité des granules d'amidon cru dans divers produits comme le maïs (Tollier & Guilbort, 1971), la pomme de terre (Varatharajan *et al.*, 2011) et le manioc (Camargo *et al.*, 1988; Valetudie *et al.*, 1993).

Quelques études ont montré que les enzymes dégradent principalement les parties amorphes des granules d'amidon (Gallant *et al.*, 1973; Leach & Schoch, 1961), cependant les parties cristallines peuvent également être affectées mais de façon plus limitée (Gallant *et al.*, 1997; Y. Zhou, Hoover, & Liu, 2004). Pour l'amidon de manioc, une étude (Franco *et al.*, 1988) a montré que seule la partie amorphe du granule est attaquée par α-amylolyse. En revanche, une autre étude sur cet amidon (Rocha *et al.*, 2010) indique que les parties amorphe et cristalline sont digérées simultanément par α-amylolyse.

Pour la production d'amidon aigre, l'hydrolyse enzymatique peut être utilisée pour renforcer, voire substituer, la fermentation naturelle de l'amidon de manioc. La fermentation dépend des bactéries lactiques, du pH, de la température, etc... (Oates, 1997). L'addition d'amylases au bac de fermentation pourrait permettre de mieux contrôler la variabilité inhérente au procédé de fermentation (Camargo *et al.*, 1988).

Protocole.

La méthodologie décrite par Tollier & Guilbort (1974) et reprise par l'INRA – Nantes a été utilisée. Cette technique permet de mesurer le degré de dégradation d'un amidon par le biais de sa susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique (Tawil, Viksø-Nielsen, Rolland-Sabaté, Colonna, & Buléon, 2010). Cette méthode est uniquement applicable à l'α-amylase pancréatique de porc (PPA) pour un rapport enzyme/substrat de 5 µg/mg.

Un tampon phosphate 20 mM de pH 7 (TpW) constitué de NaH_2PO_4 400mM et Na_2HPO_4 400mM ainsi que des solutions de NaN_3 (0,02%), NaCl (2 mM) et $CaCl_2$ (0,25 mM) ont été préparés, ainsi qu'une solution de PPA (SIGMA P7545) à 1mg.mL^{-1} dans du TpW. L'activité spécifique de cette enzyme est 0,27 µkat/g à 25°C. Le NaN_3 (0,02%) est un antibactérien, le $CaCl_2$ (0,25 mM) se lie à l'enzyme, ce qui lui permet de conserver sa structure et donc d'avoir une activité optimale et le NaCl (2 mM) permet de conserver un environnement physiologique salin. La concentration exacte *C°* de la solution de PPA a été vérifiée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 280 nm, les calculs ont été effectués de la manière suivante :

$$C° = \frac{DO}{\varepsilon \times l} \tag{21}$$

Où : *l* = longueur de la cuve (= 1 cm)

C° = concentration de la solution de PPA (= mg.L^{-1})

ε = coefficient d'extinction spécifique (= 2,5 L.mg^{-1}.cm^{-1})

DO = densité optique

Sachant que la masse exacte (*m*) de PPA pure à utiliser pour chaque réaction d'hydrolyse est 0,2 mg, le volume exact (*v*) de la solution d'enzyme à utiliser a été calculé comme suit : *v = m / C°.*

La réaction d'hydrolyse est effectuée dans les conditions suivantes : 40 mg d'amidon (base sèche) dispersé dans 40 mL de tampon TpW en présence de 0,2 mg de pancréatine. Initialement, l'amidon est dispersé dans un volume *V* de TpW égal à : *V = 40 – v*, avec *V* et *v* exprimés en mL. Cette dispersion est introduite dans des tubes à centrifugeuse de 50 mL, homogénéisée par vortex, et équilibrée sous agitation horizontale dans un bain thermostaté à 37°C pendant 10 min.

Le volume *v* de solution de pancréatine est ensuite rajouté à la dispersion, et la réaction d'hydrolyse est menée pendant 24h sous agitation horizontale à 37°C pendant 24 heures.

Des prélèvements de 1 mL sont effectués à 1, 2, 3, 5, 6 et 24 heures. Ces prélèvements sont stockés à 0°C sur de la glace pour inactiver l'enzyme. Après centrifugation à 4630 g pendant 5 min à 4°C on prélève 0,1 mL de surnageant qui sont congelés dans le but d'effectuer le dosage des oses totaux.

Ce dosage a été réalisé par la méthode du GOD-POD (McCleary, Gibson, & Mugford, 1997). Pour cela 0,2 mL d'amyloglucosidase (0,71 mg/mL) préparé avec du tampon acétate (0,5 M) à pH 4,8 a été ajouté à 0,1 mL de surnageant. Pour activer la réaction colorimétrique 2,5 mL de GOD-POD ont été rajoutés. L'incubation a été effectuée à 25°C pendant 20 minutes.

Une courbe standard a été préparée en utilisant des solutions de glucose à différentes concentrations. Les absorbances ont été lues sur le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 510 nm.

La concentration en glucose de l'échantillon *(C dosée)* a été déterminée à partir de cette courbe et de l'absorbance de la solution d'échantillon après réaction avec le GOD-POD.

Enfin, le % d'hydrolyse enzymatique a été calculé de la façon suivante :

$$\%Hydrolyse(substrat\ amylacé) = \frac{C\,dosée \times 0,9 \times V \times 100}{1000 \times m \times \%MS} \qquad (22)$$

Où : *C dosée* = concentration en glucose (µg/mL)

0,9 = facteur de conversion du glucose en amidon

V = volume réactionnel au départ (mL)

m = masse de substrat pesé (mg)

% MS = pourcentage de matière sèche du produit

Pour chaque échantillon 3 mesures ont été effectuées.

La figure suivante (**Figure 34**), montre le schéma du protocole de digestibilité enzymatique utilisé :

Hydrolyse enzymatique

Dispersion (échantillons + tampon pH 7)

Homogénéisation

Incubation avec PPA (20min à 37°C, agitation horizontale)

Prélèvement (à 1, 2, 3, 5, 6 et 24 heures)

Dossage (méthode du GOD-POD)

Lecture au spectro (absorbance à 510 nm)

Calcul du %Hydrolyse (substrat amylacé)

Figure 34. Schéma du protocole d'hydrolyse enzymatique.

3.3.14. Observations par microscopie électronique.

La fermentation peut endommager ou modifier la surface des granules d'amidon (Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998). Des observations à l'aide d'un microscope électronique à balayage permettront de vérifier l'état de la surface des granules après fermentation.

Principe.

La microscopie électronique à balayage (MEB) est largement utilisée pour observer les modifications de la structure des granules d'amidon, par exemple au cours d'un procédé. Par ailleurs, le diamètre, l'état de surface et la morphologie des granules d'amidon peuvent être étudiés par cette technique (Matos Segura & Perez Sira, 2003; Thomas & Atwell, 1988).

Pour obtenir des images par MEB, l'échantillon doit être recouvert d'une couche mince d'un métal réfléchissant, avant d'être irradié avec un faisceau d'électrons. Les électrons secondaires émis par l'échantillon permettent de former une image point par point, révélant les caractéristiques de surface dans les moindres détails (Ruste, 2013; Thomas & Atwell, 1988).

Jusqu'aux années 1990, les travaux sur l'imagerie de la surface des granules d'amidon ont été réalisés par microscopie électronique à balayage (MEB) classique. Les granules d'amidon ne sont pas, cependant, des échantillons idéaux pour l'imagerie MEB en raison de leur nature biologique particulaire et de leur faible conductivité électrique (Baldwin *et al.*, 1994; Fannon *et al.*, 1992; Gallant *et al.*, 1997, 1972 cités par BeMiller & Whistler, 2009). De plus, des échantillons observés par MEB ne peuvent être visualisés dans leur état d'origine. L'imagerie réalisée dans un vide poussé et les techniques de préparation qui lui sont associées peuvent changer la structure des produits et introduire des défauts indésirables (BeMiller & Whistler, 2009).

La microscopie électronique à balayage environnementale (EMEB) résout en partie ces difficultés. Les microscopes EMEB travaillent à vide modéré dans la chambre contenant l'échantillon sans préparation préalable (de l'ordre de 1 à 50 Torr), tandis que la colonne d'électrons est maintenue sous vide poussé (Létang, Piau, & Verdier, 1999; M. J. Li, Rogers, & Rust, 1995). L'EMEB présente des performances d'imagerie intéressantes pour des échantillons secs, humides ou huileux, réduisant ainsi les risques de dégradation ou de création de défauts en MEB lors du plaquage de métal.

Lors d'une observation EMEB sur un échantillon, l'ionisation par gaz dans la chambre d'observation de l'échantillon élimine les objets électriquement chargés généralement vus avec des échantillons non conducteurs. Malgré l'obtention d'images de contraste intéressantes dans ces conditions, la qualité d'image reste inférieure par rapport à un MEB à haut vide. Cette technique est donc intéressante pour l'observation de processus

dynamiques, par exemple : le mouillage, le séchage, l'absorption, la corrosion, la fusion, la cristallisation, la rupture *in situ* (Plummer, 2001).

3.3.14.1. Microscopie électronique à balayage (MEB).

Protocole.

L'appareil utilisé est un microscope à effet de champ Hitachi s-4800 permettant de détecter les électrons secondaires et rétrodiffusés émis par l'échantillon. La tension d'accélération varie de 0,1 kV à 30 kV. Le grossissement maximal est de 800000x. La résolution obtenue est de 1 nm à une tension de 15 kV. Une option transmission équipe ce microscope, dans le but d'observer des échantillons fins soumis à une tension de 30 kV.

Les échantillons nécessitent une préparation préalable consistant en une métallisation au Platine. Une intensité de courant de 6mA a été appliquée pendant 45 secondes. Plusieurs observations ont été effectuées sur chaque échantillon à des endroits différents.

3.3.14.2. Microscopie électronique à balayage environnemental (EMEB).

Protocole.

Le microscope à balayage environnemental analytique FEI Quanta 200 FEG (**Figure 35**), couplé à un détecteur Oxford Instruments X-MAX 50 mm^2, a été utilisé pour les observations en surface et morphologiques. Ce microscope peut être utilisé sous « haut vide » (High Vaccum), sous pression contrôlée (Low Vaccum) ou encore en mode environnemental (ESEM). La capacité à travailler à pression contrôlée ou en mode environnemental permet d'obtenir une imagerie optimale pour analyser des échantillons non conducteurs et/ou des échantillons hydratés sans préparation préalable.

La tension d'accélération peut être modifiée de 200 eV jusqu'à 30 keV, en utilisant la sonde de courant jusqu'à 100 nA. La résolution maximale réalisable sous vide à une tension de 30 keV en utilisant des électrons secondaires (SE) est de 3 nm.

Les poudres ont été directement déposées sur les onglets de charbon de bois sans aucune résine d'enrobage. Les échantillons ont été analysés sur une surface de 100 µm de côté. Le temps d'analyse pour chaque observation a été fixé à 60 s pour assurer la stabilité de l'image. La tension d'accélération est de 15 keV. Plusieurs observations ont été effectuées sur chaque échantillon en plusieurs points.



Figure 35. Microscope à balayage environnemental analytique FEI Quanta 200 FEG, couplé à un détecteur Oxford Instruments X-MAX 50mm2.

3.4. Traitements statistiques des résultats.

3.4.1. Test ANOVA et Test de Fisher.

Les différences statistiquement significatives entre les moyennes des échantillons sont déterminées en utilisant le test ANOVA suivi par un test de Fisher avec un niveau de confiance de 95%. Le logiciel Statistica v7.1 (StatSoft, Maison-Alfort, FRANCE) a été utilisé.

3.4.2. Analyse Cluster.

L'analyse multivariée Cluster est utilisée afin d'identifier les groupes d'échantillons présentant des caractéristiques similaires, en utilisant « la méthode de liaison moyenne » basée sur le calcul des distances entre les moyennes des échantillons et leurs groupes. Ces groupes ou clusters sont formés du regroupement des échantillons de mêmes caractéristiques (Sokal & Michener, 1958). L'analyse multivariée évalue les relations entre plusieurs variables différentes, issues des résultats d'expériences différentes (panification, viscosité, granulométrie, etc.). La méthode de liaison moyenne permet de construire un arbre hiérarchique, à partir d'une matrice de distance des échantillons. Ainsi, cette technique est basée sur l'utilisation d'une distance entre deux groupes découlant de la distance moyenne entre un point dans un groupe et un point dans l'autre groupe.

Le logiciel Statistica v7.1 (StatSoft, Maison-Alfort, FRANCE) a été utilisé.

3.4.3. Analyse en composantes principales (ACP).

L'ACP est utilisée afin d'identifier des groupes d'échantillons ayant des caractéristiques similaires.

L'ACP consiste à convertir des variables discrètes en coefficients non corrélées entre eux qui s'appelleront composantes principales. Ces nouvelles variables vont être projetées dans un nouveau système d'axes dans lequel la variance la plus élevée sera représentée par le premier axe ou première composante principale, la deuxième variance plus importante associée au deuxième axe, etc. Classiquement, ces deux axes expliqueraient la majeure partie de la variance des variables initiales pour l'interprétation des résultats (Pearson, 1901).

Le logiciel The Unscrambler X 10.2 (Camo) a été utilisé.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Caractérisation physico-chimique et structurelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil

4.1.1. Composition chimique

4.1.1.1. Teneur en amylose.

Objectif.

Déterminer la teneur en amylose des différents génotypes. Montrer l'influence du lieu géographique et de la variété sur cet indicateur.

Analyse des résultats.

Les teneurs en amylose des échantillons NO sont indiquées dans le **Tableau 14**. Seuls les échantillons non modifiés ont été analysés car la teneur en amylose est peu

influencée par les différents traitements, selon Franco *et al.* (2010). Les teneurs en amylose obtenues dans cette étude sont en accord avec la littérature (Ceballos *et al.*, 2008; Onitilo *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009).

Tableau 14

Teneur en amylose des amidons natifs (NO).

Génotype	Teneur en amylose (%) [y]
Plaine	
HMC-1	21,7(0,4)[g]
CM6438-14	19,6(0,3)[f]
CM4574-7	21,6(0,8)[g]
Altitude	
CM7436-7	19,3(0,1)[ef]
CM7438-14	20,1(0,3)[f]
SM1498-4a	18,7(0,1)[de]
CM7138-7	17,6(0,1)[c]
SM7591-5	18,5(0,2)[d]
Cumbre 3	16,7(0,5)[bc]
SM707-17	15,7(0,0)[a]
SM1495-5	16,0(0,3)[ab]
SM1058-13	19,3(0,5)[def]
Tambo 4	16,7(0,1)[bc]
Plaine	21,2(1,1)[b]
Altitude	18,0(1,5)[a]
Tous	18,8(2,0)

[y] Valeurs obtenues à partir des analyses DSC.

[a-h] Les différentes lettres, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

L'altitude semble être un facteur déterminant de la teneur en amylose. La teneur moyenne en amylose des génotypes de plaine (21,2%) est significativement plus élevée que celle d'altitude (18,0%). Une explication possible serait une différence de la biosynthèse de l'amidon à diverses altitudes liée à des activités enzymatiques différentes, du fait des températures distinctes dans les deux localités. D'autre part, la diversité génotypique peut également jouer un rôle important, en synergie avec l'effet d'altitude.

Une grande variabilité dans la teneur en amylose a été trouvée entre les génotypes, comme l'indique le test de Fisher (cf. **Tableau 14**) et l'analyse Cluster (**Figure 36**). Ces tests montrent 3 groupes :

i) Un groupe constitué de 4 échantillons (Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5 et Tambo 4) à faibles teneurs en amylose (15,7% à 16,7%).

ii) Un groupe composé par 7 génotypes (CM6438-14, CM7436-7, CM7438-14 CM7438-14, SM1498-4a, CM7138-7, et SM1058-13 et SM7591-5) de teneurs en amylose intermédiaires (17,6% à 20,1%).

iii) Un groupe de 2 génotypes (HMC-1 et CM4574-7) de teneurs en amylose élevées (21,6% à 21,7%).

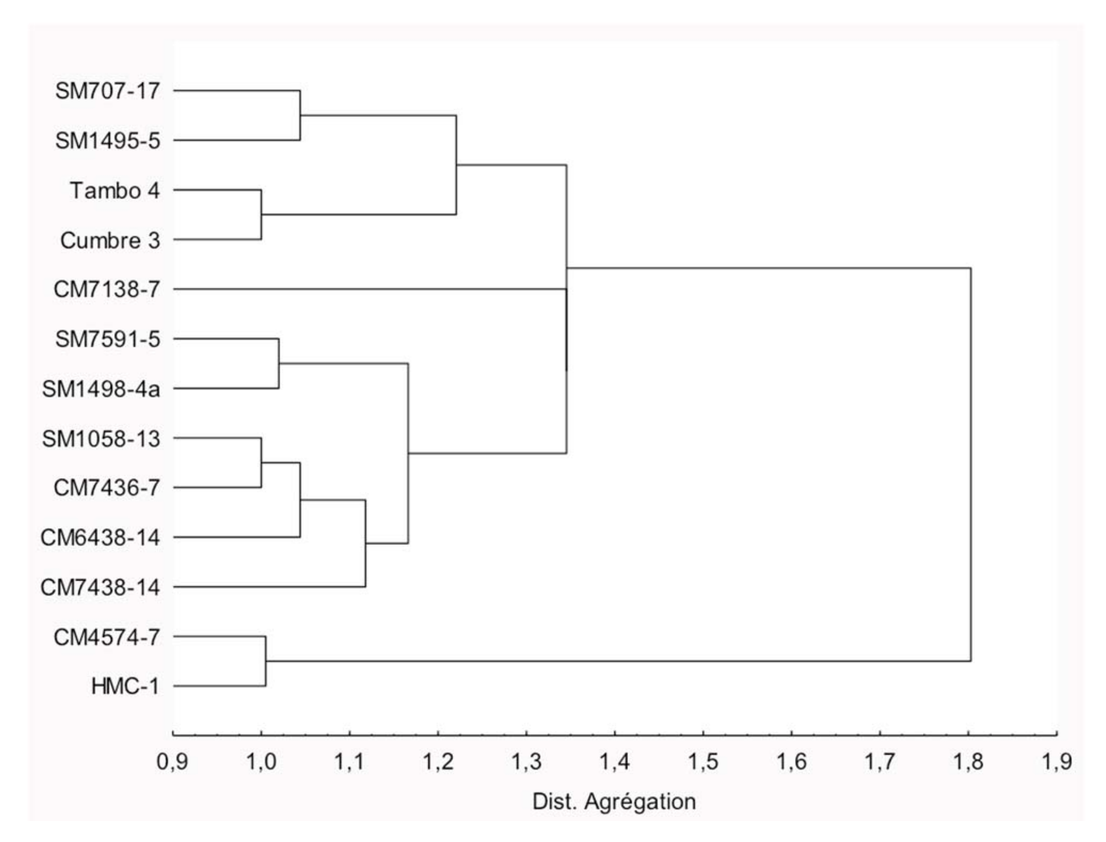


Figure 36. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre la teneur en amylose des différentes variétés soumises au traitement NO.

4.1.1.2. pH

Objectifs.

L'objectif est de mesurer le pH des amidons de manioc natifs, fermentés et/ou séchés au soleil, et de vérifier l'influence des traitements, du génotype et du lieu géographique de culture sur ce paramètre.

Analyse des résultats.

Le **Tableau 15** rassemble les valeurs du pH des 52 échantillons : 13 génotypes soumis à NO, NS, FO et FS.

Tableau 15

pH des amidons natifs, fermentés et/ou séchés au soleil.

Génotype	pH			
	NO[z]	NS[z]	FO[z]	FS[z]
Plaine				
HMC-1	8,2	8,4	3,4	4,4
CM6438-14	7,7	7,8	3,5	4,8
CM4574-7	8,0	8,0	3,5	4,3
Altitude				
CM7436-7	8,3	8,2	4,2	5,8
CM7438-14	8,3	8,3	5,3	5,5
SM1498-4a	7,8	7,9	4,1	4,5
CM7138-7	8,1	8,2	3,9	4,1
SM7591-5	8,2	8,2	4,0	4,4
Cumbre 3	7,8	8,0	4,1	4,5
SM707-17	8,1	8,1	4,0	4,3
SM1495-5	8,2	8,2	4,1	4,1
SM1058-13	8,3	8,4	5,5	5,3
Tambo 4	8,0	8,1	4,1	4,4
Plaine	8,0(0,2)[c]	8,1(0,3)[c]	3,5(0,1)[a]	4,5(0,2)[b]
Altitude	8,1(0,2)[c]	8,2(0,1)[c]	4,3(0,5)[a]	4,7(0,6)[b]
Tous	8,1(0,2)[c]	8,1(0,2)[c]	4,1(0,6)[a]	4,7(0,5)[b]

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four ; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four ; FS : fermenté, séché au soleil.

[a-c] Les lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Les échantillons natifs (NO) et non fermentés, séchés au soleil (NS) ont un pH égal à 8,1. Ces résultats sont plus élevés que ceux présentés dans la littérature (**Tableau 16**).

La fermentation diminue significativement le pH, du fait de la formation d'acides organiques, en particulier l'acide lactique. Les échantillons fermentés séchés au four (FO) ont un pH de l'ordre de 4,2 en conformité avec la littérature (**Tableau 16**). Les échantillons fermentés séchés au soleil (FS) ont un pH de 4,7. Ces résultats sont sensiblement plus élevés que dans la littérature (**Tableau 16**).

Tableau 16

pH des amidons natifs, fermentés et/ou séchés au soleil selon la littérature.

Traitement	pH amidon du manioc	Temps de fermentation (jours)
Natif	4,97 – 6,10 [a] ; 6,8 [b] ; 6,3 [c]	-
Fermenté	4,0 [c] ; 3,47 [d] ; 3,45 – 3,48 [b]; 3,4 – 3,9 [e] ; 4,76 [a]	4-8 [c] ; 30 [d] ; 33 [b] ; 25-40 [e] ; n.d. [ag]
Fermenté et séché au soleil	3,73 – 4,36 [a]; 3,5 – 4,0 [f]; 3,55 – 3,7 [b]; 3,35 – 4,32 [a]	n.d. [ag] ; 20 – 30 [f] ; 33 [b] ; 25 [a]

[a] (Marcon *et al.*, 2009)
[b] (Dufour *et al.*, 1995)
[c] (Mestres *et al.*, 2000)
[d] (Ampe *et al.*, 2001)
[e] (Onitilo *et al.*, 2007)
[f] (Cárdenas & de Buckle, 1980)
[g] n.d.= non déterminé

Après irradiation solaire des échantillons fermentés (traitement FS), le pH moyen augmente de 4,2 (FO) à 4,7 (FS). Dufour *et al.* (1995) ont obtenu des résultats similaires, avec une augmentation du pH de l'ordre de 0,2 unités après irradiation solaire des échantillons fermentés. Ces observations suggèrent que l'acide lactique est consommé et/ou transformé en une autre molécule par réaction chimique lors du séchage solaire (Mestres & Rouau, 1997). Cependant, d'autres travaux (Marcon *et al.*, 2009) n'ont pas trouvé de changement significatif du pH après irradiation d'amidon de manioc fermenté.

Les traitements physicochimiques (fermentation et irradiation UV) n'ont montré aucune différence significative entre les échantillons de plaine et d'altitude. La baisse de pH après fermentation est similaire pour les deux catégories d'échantillons (cf. exemple d'une variété de plaine et deux d'altitude, **Figure 37**).

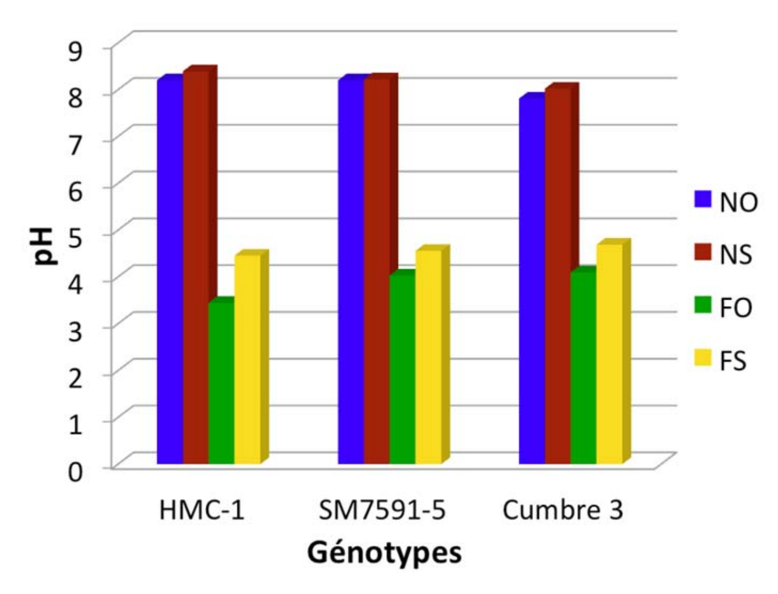


Figure 37. pH de 3 génotypes d'amidon du manioc lors de 4 traitements (NO, NS, FO et FS).

Concernant les différences entre plaine et altitude, seul le traitement FO induit une différence significative en termes de pH, avec un pH moyen de 3,5 et 4,3 respectivement pour les deux catégories.

Une variabilité importante du pH a été observée entre différentes variétés, quel que soit le traitement (**Figures 38, 39, 40 et 41**). D'autre part, la variabilité du pH est évidente entre les différents traitements. Après fermentation, le pH des échantillons diminue de 2,8 jusqu'à 4,8 unités pH par rapport au traitement natif. Par contre, le séchage au soleil augmente entre 0,2 et 1,2 unités le pH des amidons fermentés, séchés au four (sauf 2 exceptions : SM1495-5 et SM1058-13 où le pH diminue de 0,02 et 0,18 respectivement).

Finalement, aucune corrélation n'a pu être identifiée entre la capacité de panification (recette boulangère et recette HPMC) et les mesures de pH. Le pH ne permet donc pas de prédire le pouvoir de panification, selon nos résultats. En revanche, Marcon *et al.* (2011) ont trouvé une bonne corrélation entre le pH et une formulation de panification contenant de l'amidon et de l'eau.

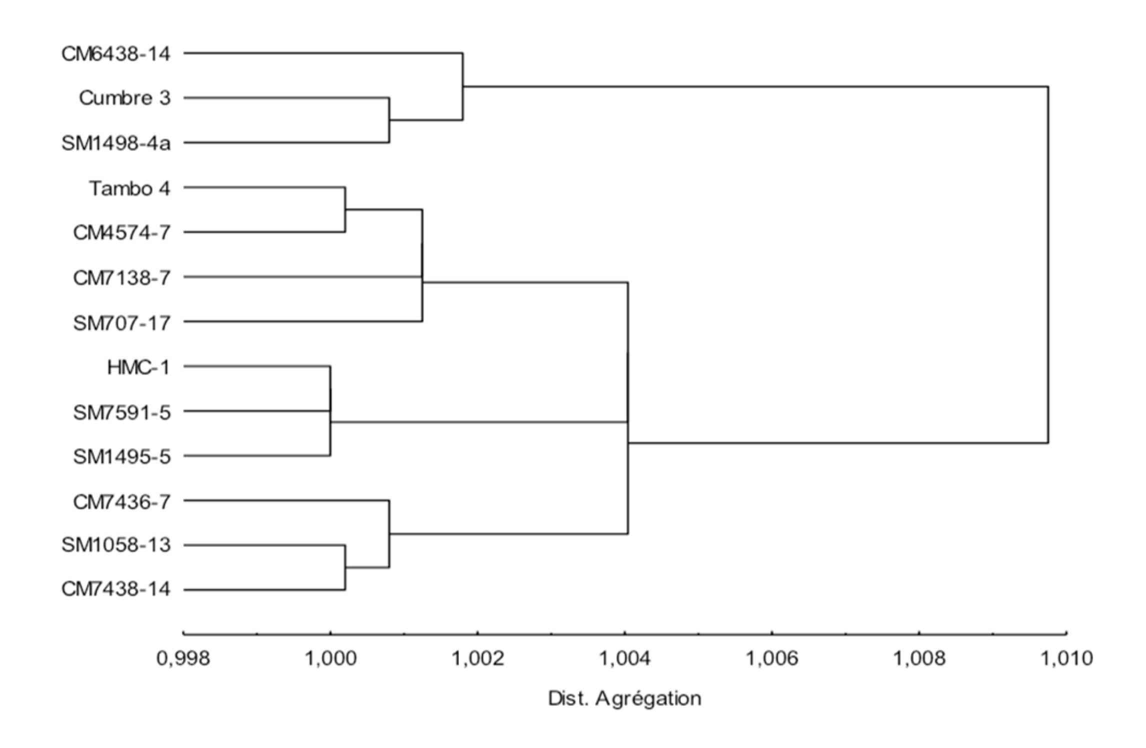


Figure 38. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les pH des variétés soumises au traitement NO.

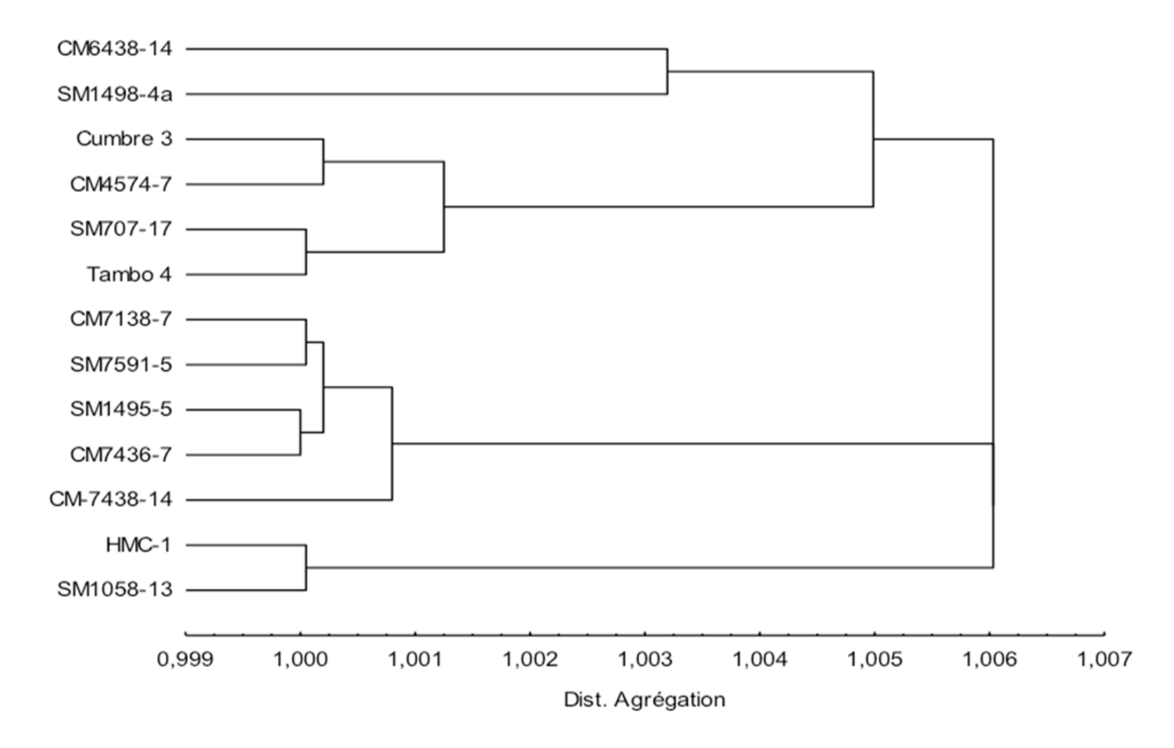


Figure 39. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les pH des variétés soumises au traitement NS.

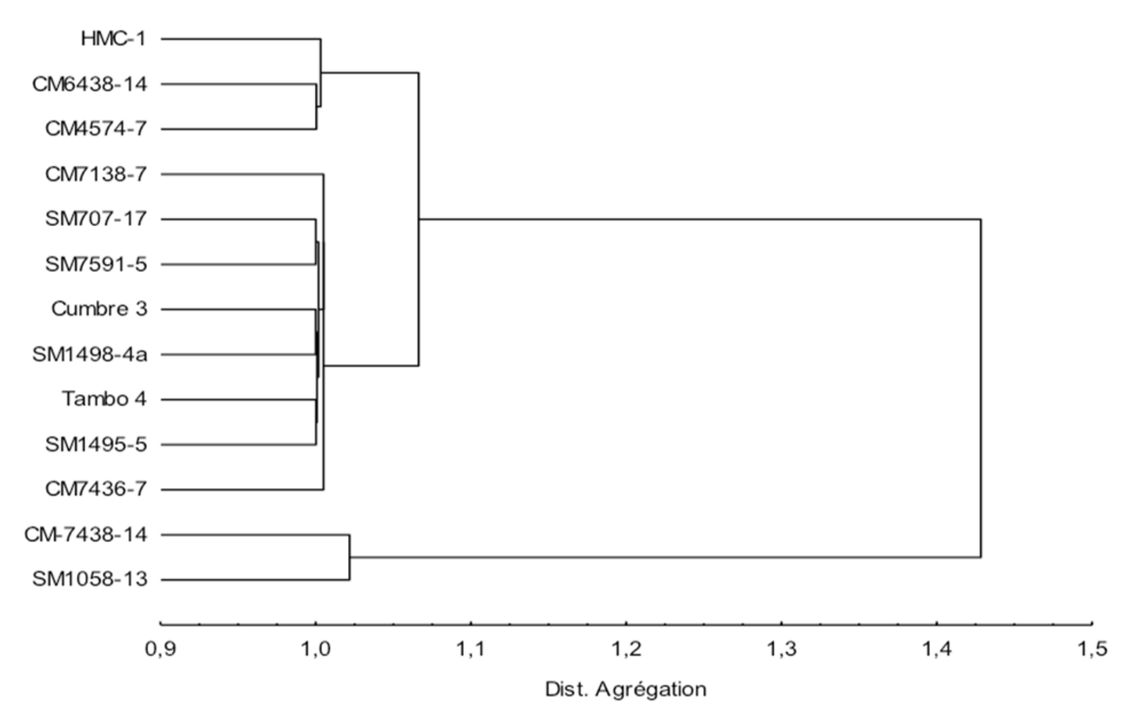


Figure 40. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les pH des variétés soumises au traitement FO.

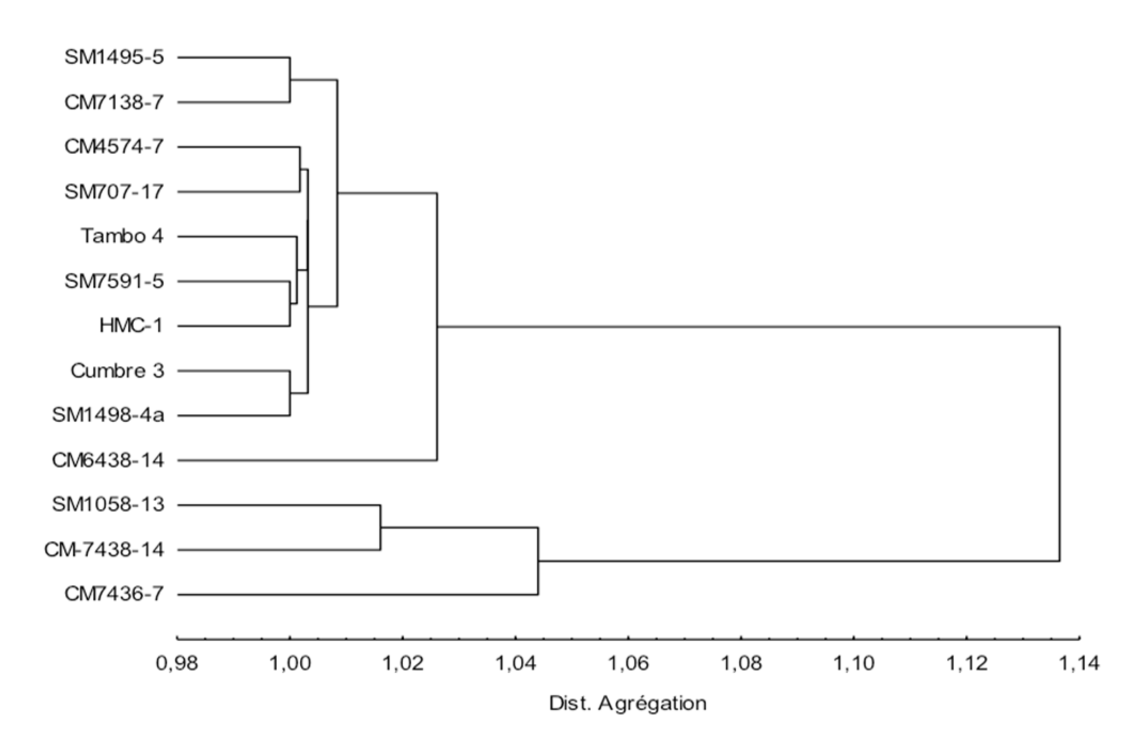


Figure 41. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les pH des variétés soumises au traitement FS.

4.1.1.3. Spectrophotométrie UV.

Objectifs.

Déterminer les bandes de réflectance UV des échantillons analysés et relier ces bandes aux énergies des liaisons.

Vérifier si ces énergies correspondent à des composés qui auraient été modifiés par des phénomènes d'oxydation.

Constater s'il existe une influence des traitements sur les différents génotypes du manioc.

Analyse des Résultats.

13 génotypes soumis à 3 traitements différents (NO, FO et FS) ont été analysés en réflectance UV.

En général, les spectres de réflectance diffuse des amidons montrent des bandes d'absorption à 226 nm (bande I), 262 nm (bande II) et une dernière de faible intensité entre 359-367 nm (bande III) (**Figure 42** et **Tableau 17**). Les spectres des échantillons étudiés sont similaires à ceux obtenus par Bertolini *et al.* (2001) qui ont mis en évidence des bandes à 210, 260-290 et 350 nm.

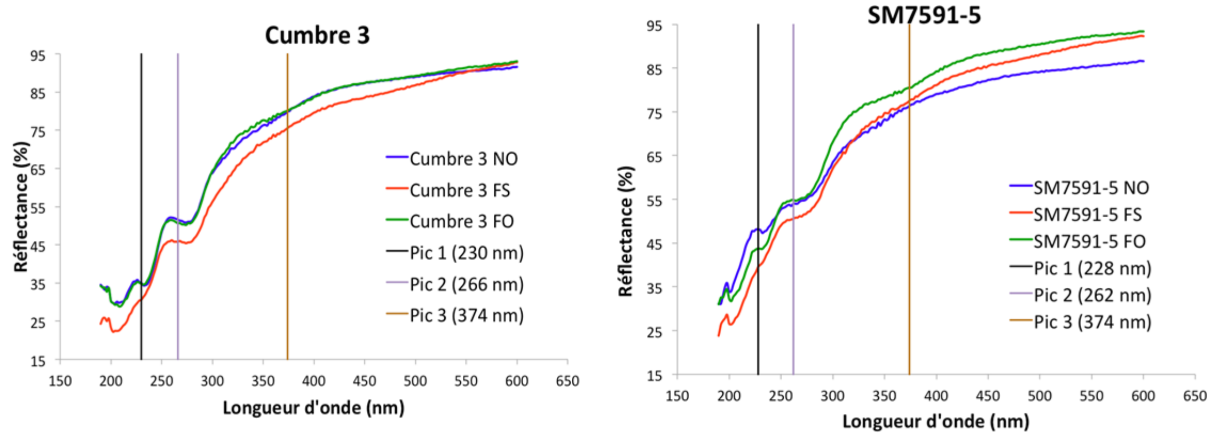


Figure 42. Spectres UV visible de réflectance diffuse de deux échantillons d'amidon de manioc Cumbre 3 et SM7591-5 lors de 3 traitements : NO (bleu), FO (vert) et FS (rouge).

Le **Tableau 17** résume les longueurs d'onde des différentes bandes de réflectance UV des amidons du manioc natifs, fermentés et/ou séchés au soleil.

La réflectance UV indique qu'il y n'a pas d'effet du traitement ou du génotype sur les échantillons analysés (**Figure 42**). En revanche, les échantillons de plaine semblent légèrement plus sensibles aux traitements de fermentation (FO) et de fermentation associée au séchage au soleil (FS), avec un décalage de la longueur d'onde de la bande III de 349 à 363-365 nm, contre 362 à 367 nm pour les échantillons d'altitude.

Tableau 17

Spectrophotométrie UV en réflectance des amidons de manioc natifs, fermentés et/ou séchés au soleil.

Génotype	NO [z]			FO [z]			FS [z]		
	Longueur d'onde (nm)								
	Bande I	Bande II	Bande III	Bande I	Bande II	Bande III	Bande I	Bande II	Bande III
Plaine									
HMC-1	226	262	344	224	262	366	224	262	360
CM6438-14	224	262	346	232	264	362	224	264	360
CM4574-7	226	262	356	224	262	368	224	264	368
Altitude									
CM7436-7	226	262	364	224	262	372	224	262	370
CM7438-14	226	262	356	226	264	364	226	262	362
SM1498-4a	226	260	358	224	262	370	226	262	372
CM7138-7	226	262	368	226	264	360	226	260	376
SM7591-5	226	262	366	224	264	366	228	262	364
Cumbre 3	226	262	368	226	264	364	226	262	364
SM707-17	226	264	356	226	262	374	226	262	364
SM1495-5	226	264	360	226	262	364	226	262	364
SM1058-13	226	262	370	224	262	370	226	264	362
Tambo 4	224	262	358	224	262	370	226	262	368
Plaine	225,3(1,2)[a]	262,0(0,0)[b]	348,7(6,4)[c]	226,7(4,6)[a]	262,7(1,2)[b]	365,3(3,1)[d]	224,0(0,0)[a]	263,3(1,2)[b]	362,7(4,6)[d]
Altitude	225,8(0,6)[a]	262,2(1,1)[b]	362,4(5,4)[c]	225,0(1,1)[a]	262,8(1,0)[b]	367,4(4,4)[d]	226,0(0,9)[a]	262,0(0,9)[b]	366,6(4,7)[cd]
Tous	225,7(0,8)[a]	262,2(1,0)[b]	359,2(8,1)[c]	225,4(2,2)[a]	262,8(1,0)[b]	366,9(4,1)[d]	225,5(1,2)[a]	262,3(1,1)[b]	365,7(4,8)[d]

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FO : fermenté, séché au four; FS : fermenté, séché au soleil.

[a-d] Les lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).
Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

La comparaison entre plaine et altitude montre une différence significative uniquement des échantillons natifs (NO) sur la bande III d'environ 4% (348,7 et 362,4 nm, respectivement). Cette différence disparaît après les traitements FO et FS.

La longueur d'onde plus faible pour la réflectance de la bande III des génotypes de plaine entraîne une augmentation de la réflectance de 4,8 et 4,0% après les traitements de fermentation (FO et FS respectivement), contre seulement 1,4% pour les génotypes d'altitude.

Ces bandes d'absorbance à 226, 262 et 359 - 367 nm correspondent aux énergies de liaison C-C, C-H, C-O, O-H. L'irradiation UV au cours du séchage peut donc apporter l'énergie nécessaire pour rompre ces liaisons et initier les réactions d'oxydation aboutissant à la formation de fonctions aldéhydes et cétones. L'irradiation UV pourrait également mener à la formation de radicaux libres, contribuant à la rupture des liaisons glucosidiques de l'amidon (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001).

La titration des groupes aldéhydes, carbonyle et carboxyle a été envisagée pour confirmer un tel mécanisme d'oxydation (résultats montrés dans le chapitre oxydation), et préciser le ou les site(s) préférentiels d'attaque par les UVs sur les unités glucosidiques.

4.1.2. Structure moléculaire des amidons

4.1.2.1. Viscosité Intrinsèque.

Objectif.

Montrer l'influence du lieu géographique et des traitements sur la viscosité intrinsèque des échantillons.

Tester l'hypothèse selon laquelle les traitements de fermentation et séchage solaire endommagent toute la structure des granules d'amidon des génotypes d'altitude (couches externes et noyau), et seulement les couches externes des granules des génotypes de plaine. Démontrer, d'une part, que la viscosité intrinsèque des génotypes de plaine ne change pas significativement après traitements, puisque selon l'hypothèse la masse moléculaire de l'amidon contenu dans le noyau des granules n'est pas affectée. D'autre part, démontrer que la viscosité intrinsèque des génotypes d'altitude diminue après traitements, puisque l'amidon contenu dans les granules est partiellement hydrolysé, ce qui réduit sa masse moléculaire.

Analyse des résultats.

Le **Tableau 18** rassemble les résultats de la viscosité intrinsèque de 7 génotypes d'amidon de manioc soumis à 4 traitements (NO, NS, FO et FS).

Les valeurs moyennes de viscosité intrinsèque montrent la séquence suivante : NO > FO ≈ NS > FS, ce qui est comparable aux résultats de la littérature (Bertolini, Mestres, Colonna, *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997). Les valeurs mesurées de viscosité intrinsèque diffèrent de la littérature, ce qui peut s'expliquer par les traitements spécifiques NS, FO, FS subis par les échantillons, ainsi que par certaines différences dans le protocole de mesure (Bertolini, Mestres, Colonna, *et al.*, 2001; Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997).

Tableau 18

Viscosité Intrinsèque des amidons natifs, fermentés et/ou séchés au soleil.

Génotype	Viscosité Intrinsèque (mL/g)			
	Traitements ^{z}			
	NO ^{z}	NS ^{z}	FO ^{z}	FS ^{z}
Plaine				
HMC-1	140,8	147,1	134,6	115,9
CM4574-7	183,6	162,6	170,7	90,5
Altitude				
CM7138-7	189,7	122,0	140,0	101,6
SM7591-5	217,2	176,4	162,5	163,3
Cumbre 3	176,6	128,6	152,1	135,9
SM707-17	188,2	149,7	142,7	146,2
SM1495-5	220,0	152,8	158,5	108,0
Plaine	162,2(30,2)^{b}	152,6(25,6)^{b}	154,9(11,0)^{b}	103,2(17,9)^{a}
Altitude	198,3(19,2)^{b}	151,2(9,7)^{a}	145,9(21,6)^{a}	131,0(25,9)^{a}
Tous	188,0(26,6)^{c}	148,4(18,7)^{b}	151,6(13,1)^{b}	123,0(26,2)^{a}

^{z} Traitements : NO : non fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four et FS : fermenté, séché au soleil.

$^{a-c}$ Les lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

La baisse de viscosité intrinsèque après traitements est la suivante : 19,4% et 21,1% après FO et NS respectivement par rapport à NO, et 34,6% après le traitement combiné FS par rapport à NO.

Pour les échantillons de plaine, la viscosité intrinsèque diminue peu suite aux traitements NS et FO (respectivement 5,9% et 4,5% par rapport à NO). Seul le traitement

combiné de fermentation et séchage au soleil (FS) diminue la viscosité intrinsèque de 36,4% par rapport à NO.

Pour les échantillons d'altitude, la viscosité intrinsèque diminue fortement dès les traitements NS et FO (respectivement 23,8% et 26,4% par rapport à NO). Le traitement combiné FS entraine quant à lui une diminution de 33,9% par rapport à NO.

Par ailleurs, un effet variétal important a été observé pour la viscosité intrinsèque quels que soient les traitements (**Tableau 18**). Une analyse Cluster (**Figure 43, 44, 45 et 46**) confirme que les 13 génotypes étudiés peuvent être classifiés en 3 groupes de viscosités, faible, intermédiaire et élevée, pour chaque traitement (NO, NS, FO et FS).

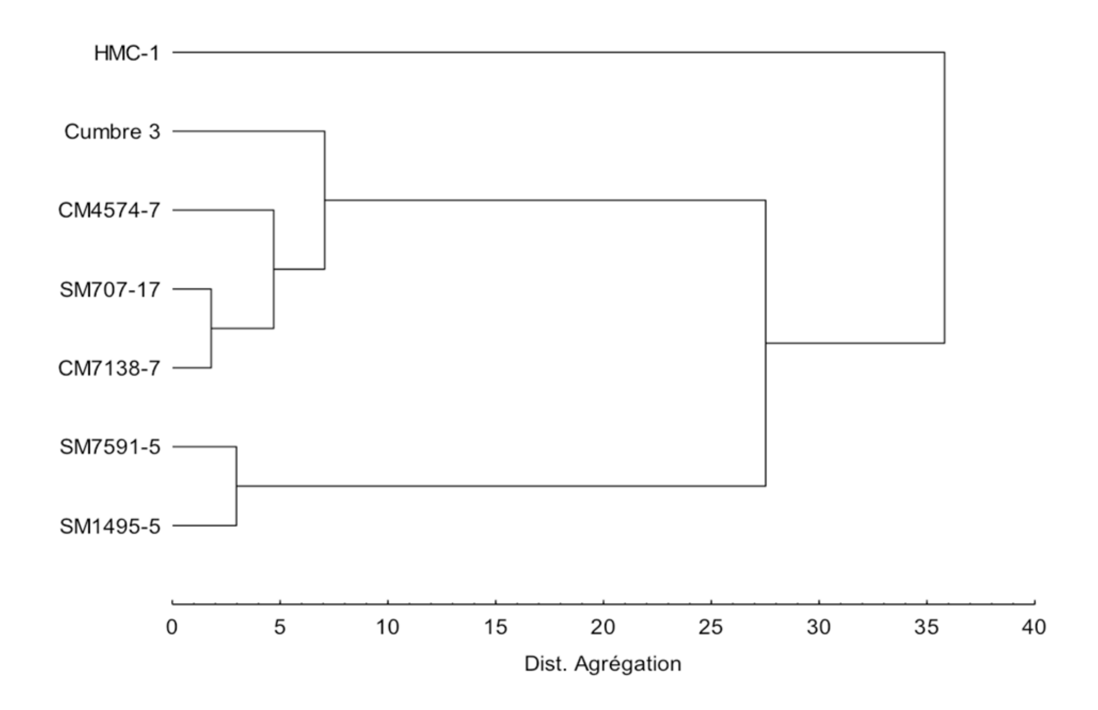


Figure 43. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre la viscosité intrinsèque des différentes variétés soumises au traitement NO.

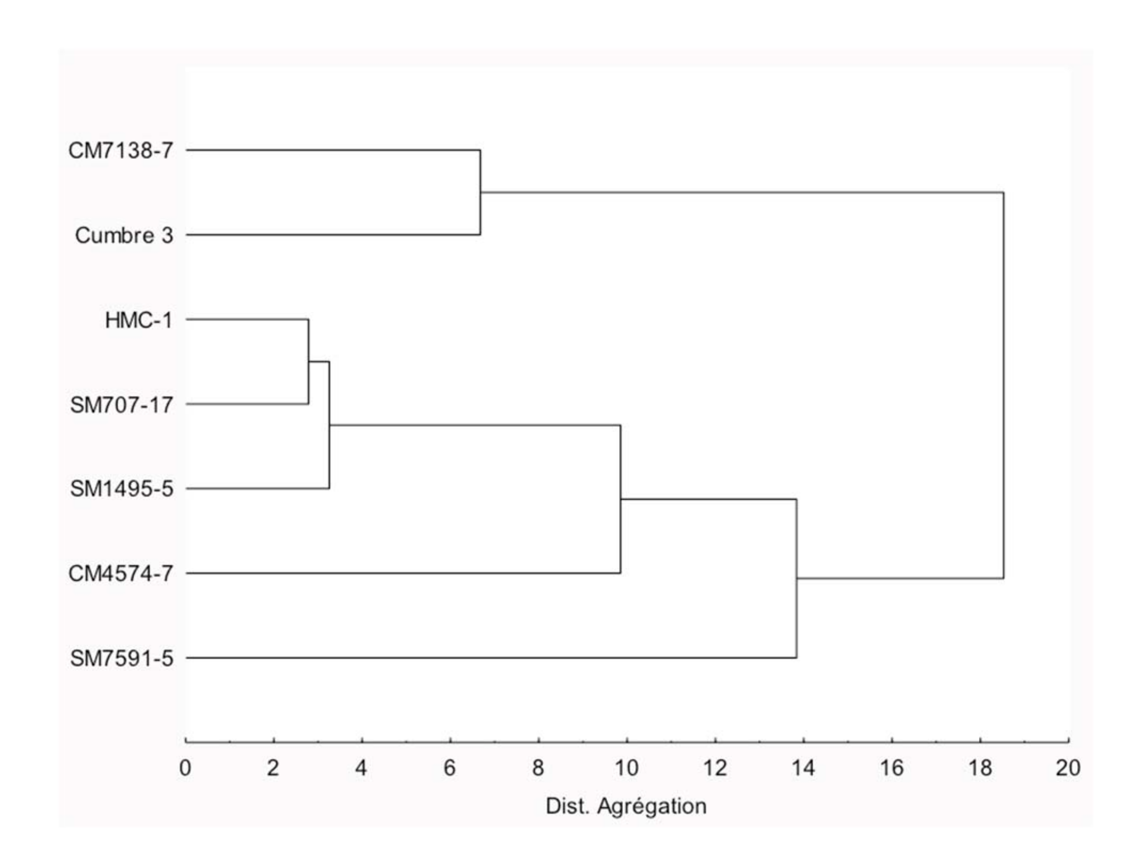


Figure 44. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre la viscosité intrinsèque des différentes variétés soumises au traitement NS.

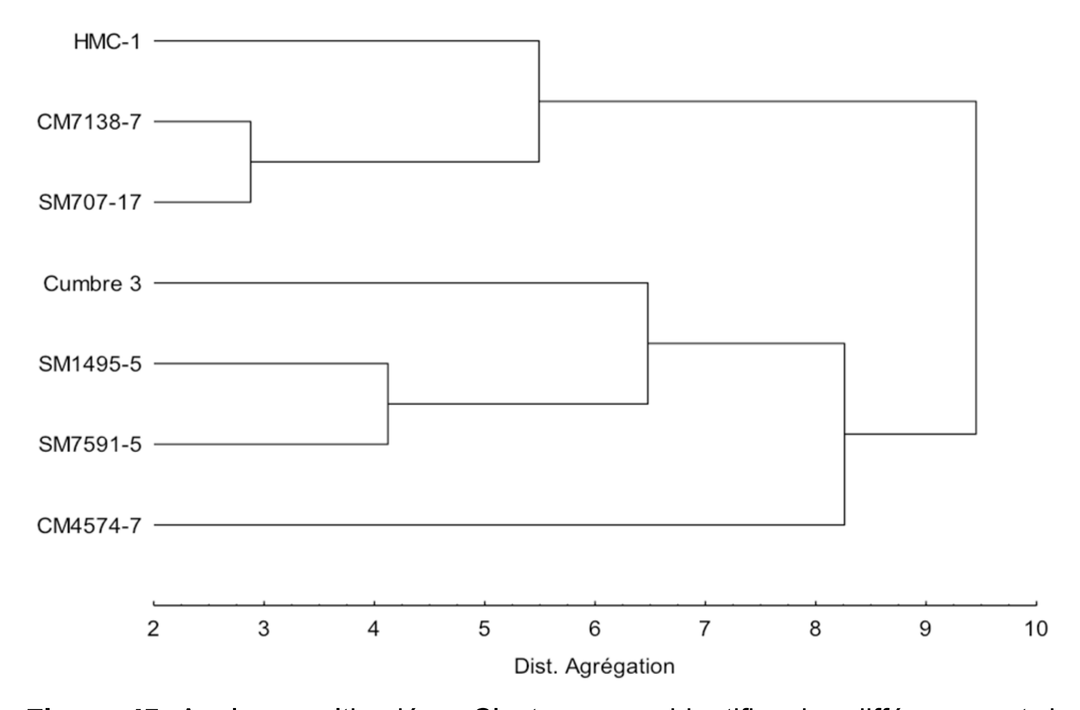


Figure 45. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre la viscosité intrinsèque des différentes variétés soumises au traitement FO.

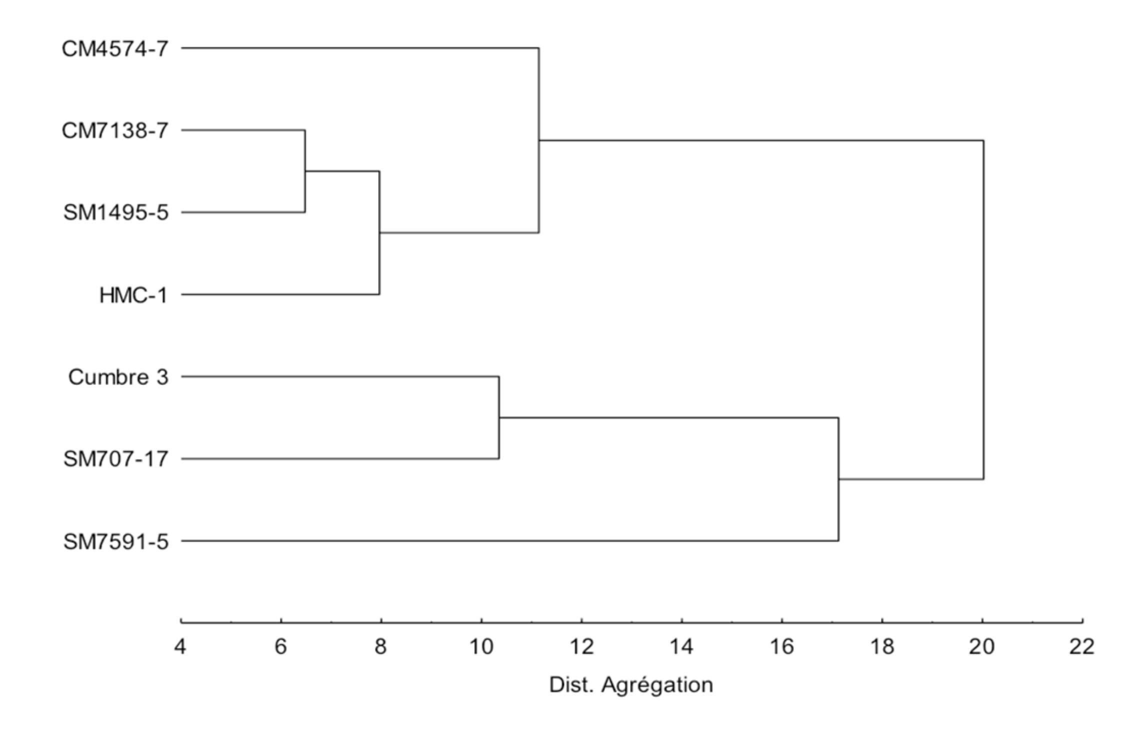


Figure 46. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre la viscosité intrinsèque des différentes variétés soumises au traitement FS.

4.1.2.2. Teneur en groupements carbonyle et carboxyle.

Objectif.

Déterminer la teneur en groupes carbonyle et carboxyle des échantillons fermentés et séchés au soleil (FS), ce qui permettrait de confirmer l'oxydation des molécules d'amidon au cours du procédé FS par rapport aux amidons natifs.

Analyse des résultats.

Les teneurs en carbonyle et carboxyle de 13 échantillons soumis aux traitements (NO et FS) ont été analysés (**Tableau 19**).

4.1.2.2.1. Teneur en groupements carbonyle

La teneur moyenne en groupements carbonyle des génotypes d'amidon de manioc FS a été $6{,}0.10^{-3}$ ($\pm 5{,}9.10^{-3}$) moles de CO par mole de GU, ce qui correspond aux résultats d'une précédente étude (Guerra-Dias *et al.*, 2011) ($4{,}1.10^{-3}$ mol CO/mol GU). La grande variabilité entre les génotypes de manioc se traduit par des écarts-types élevés, et peut indiquer différentes sensibilités à l'oxydation (cf. test de Fisher **Tableau 19**. et cluster **Figure 47**). Cette variabilité a pu masquer les autres facteurs potentiels explicatifs de la différence, comme l'altitude de culture.

4.1.2.2.2. Teneur en groupements carboxyle

La teneur moyenne en groupements carboxyle FS obtenue ($2,9.10^{-4}$ molCOOH/mol GU) est 30 fois plus faible que dans la littérature (Demiate *et al.*, 2000 et Guerra-Dias *et al.*, 2011 avec $8,5.10^{-3}$ et $1,0.10^{-3}$ mol COOH/mol GU, respectivement).

La variabilité importante entre les génotypes de manioc se traduit par des écarts-types élevés, et peut indiquer différentes sensibilités à l'oxydation (cf. test de Fisher **Tableau 19**. et cluster **Figure 48**). Cette variabilité a pu masquer les autres facteurs potentiels explicatifs de la différence, comme l'altitude de culture.

Le **Tableau 19** indique le contenu carbonyle et carboxyle des génotypes analysés.

Tableau 19

Contenu en groupements carbonyle et carboxyle des amidons de manioc natifs et fermentés, séchés au soleil.

Génotype	Contenu en groupements carbonyle (molCO/molGU)	Contenu en groupements Carboxyle (molCOOH/molGU)	Somme (CO+COOH)
	FS [z]	FS - NO [z]	
Plaine			
HMC-1	$4,6.10^{-3}(1,2.10^{-3})$ [bc]	$4,7.10^{-4}(4,3.10^{-5})$ [de]	$5,1.10^{-3}$
CM6438-14	$5,4.10^{-3}(1,9.10^{-3})$ [c]	-	-
CM4574-7	$1,4.10^{-3}(1,3.10^{-3})$ [ab]	-	-
Altitude			
CM7436-7	$2,2.10^{-2}(2,3.10^{-3})$ [e]	$4,7.10^{-4}(1,0.10^{-6})$ [ef]	$2,3.10^{-2}$
CM7438-14	$1,0.10^{-2}(3,1.10^{-3})$ [d]	Traces [a]	$1,0.10^{-2}$
SM1498-4a	$3,2.10^{-3}(1,1.10^{-3})$ [ab]	$2,0.10^{-4}(1,5.10^{-4})$ [bc]	$3,4.10^{-3}$
CM7138-7	$7,0.10^{-4}(1,8.10^{-3})$ [a]	$2,0.10^{-4}(7,0.10^{-6})$ [bc]	$9,1.10^{-4}$
SM7591-5	$3,5.10^{-3}(1,1.10^{-3})$ [abc]	$1,2.10^{-4}(1,5.10^{-5})$ [b]	$3,6.10^{-3}$
Cumbre 3	$1,0.10^{-2}(7,9.10^{-4})$ [d]	-	$1,0.10^{-2}$
SM707-17	$4,3.10^{-3}(3,0.10^{-3})$ [bc]	$6,8.10^{-4}(8,0.10^{-5})$ [f]	$5,0.10^{-3}$
SM1495-5	$1,8.10^{-3}(1,4.10^{-3})$ [ab]	$2,5.10^{-4}(1,7.10^{-4})$ [bc]	$2,1.10^{-3}$
SM1058-13	$3,1.10^{-3}(1,6.10^{-3})$ [abc]	$4,3.10^{-4}(4,0.10^{-5})$ [de]	$3,5.10^{-3}$
Tambo 4	$9,4.10^{-3}(2,4.10^{-3})$ [d]	$3,2.10^{-4}(3,2.10^{-5})$ [cd]	$9,7.10^{-3}$
Plaine	$3,8.10^{-3}(2,2.10^{-3})$ [a]	$4,7.10^{-4}(4,3.10^{-5})$ [a]	$4,3.10^{-3}$
Altitude	$6,9.10^{-3}(6,4.10^{-3})$ [a]	$2,7.10^{-4}(2,7.10^{-4})$ [a]	$7,0.10^{-3}$
Tous	$6,1.10^{-3}(5,8.10^{-3})$	$2,9.10^{-4}(2,6.10^{-4})$	$6,9.10^{-3}(6,2.10^{-3})$

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FS : fermenté, séché au soleil.

[a-f] Les lettres différentes, dans chaque colonne, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher). Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

GU : Unité glucose dans la molécule d'amidon

Par ailleurs, l'effet oxydatif du traitement FS est confirmé par la teneur en carboxyle plus élevée dans les échantillons FS que dans les échantillons NO comme reporté par Da Silva *et al.* (2006) et Guerra-Dias *et al.* (2011) qui ont trouvé FS = $1{,}1.10^{-2}$ mol COOH/mol GU > NO = $8{,}3.10^{-3}$ mol COOH/mol GU et FS = $2{,}3.10^{-3}$ mol COOH / mol GU > NO = $1{,}3.10^{-3}$ moles COOH/mol GU, respectivement.

Oxydation totale (somme de teneurs en groupements carbonyle et carboxyle)

La teneur en groupes carbonyle et carboxyle des échantillons FS confirme que l'oxydation a dû se dérouler pendant la fermentation et/ou le séchage au soleil.

L'oxydation totale moyenne est $6{,}8.10^{-3}$ ($\pm 6{,}2.10^{-3}$) moles CO + COOH/mol GU en accord avec la littérature (Guerra-Dias *et al.*, 2011) ($5{,}1.10^{-3}$ moles CO + COOH/mol GU). Par ailleurs, les groupes carbonyles ont été le principal groupe fonctionnel détecté dans l'oxydation totale, en accord avec Guerra Dias *et al.* (2011), ce qui semble indiquer une attaque préférentielle sur les carbones 2, 3, 4 ou 5 des unités glucosidiques.

On peut noter par ailleurs la grande variabilité de sensibilité à l'oxydation des différentes variétés de manioc, qui se traduit par des écarts-types élevés.

Un test de Fisher et une analyse Cluster (**Figure 49**) sur les données d'oxydation totale a identifié deux groupes d'échantillons : le groupe des échantillons d'oxydation plus élevée formé par 3 génotypes (Tambo 4, CM7438-14, et CM7436-7 comprise entre $1{,}1.10^{-3}$ à $2{,}3.10^{-3}$ moles CO + COOH / mol GU) et le groupe d'échantillons de plus faible oxydation totale contenant 6 génotypes (SM1498-4a, CM7138-7, SM7591-5, SM1495-5, HMC-1 et SM707-17 avec des valeurs comprises entre $9{,}1.10^{-4}$ à $5{,}1.10^{-3}$ mol CO + COOH/mol GU).

Enfin, nous n'avons pas observé de corrélations entre la capacité de panification et la teneur en groupements carbonyle et/ou carboxyle. Nos résultats ont montré que les modifications au niveau supramoléculaire (structure granulaire) peuvent être le principal déterminant de la capacité de panification, avec des changements au niveau moléculaire ayant un rôle secondaire.

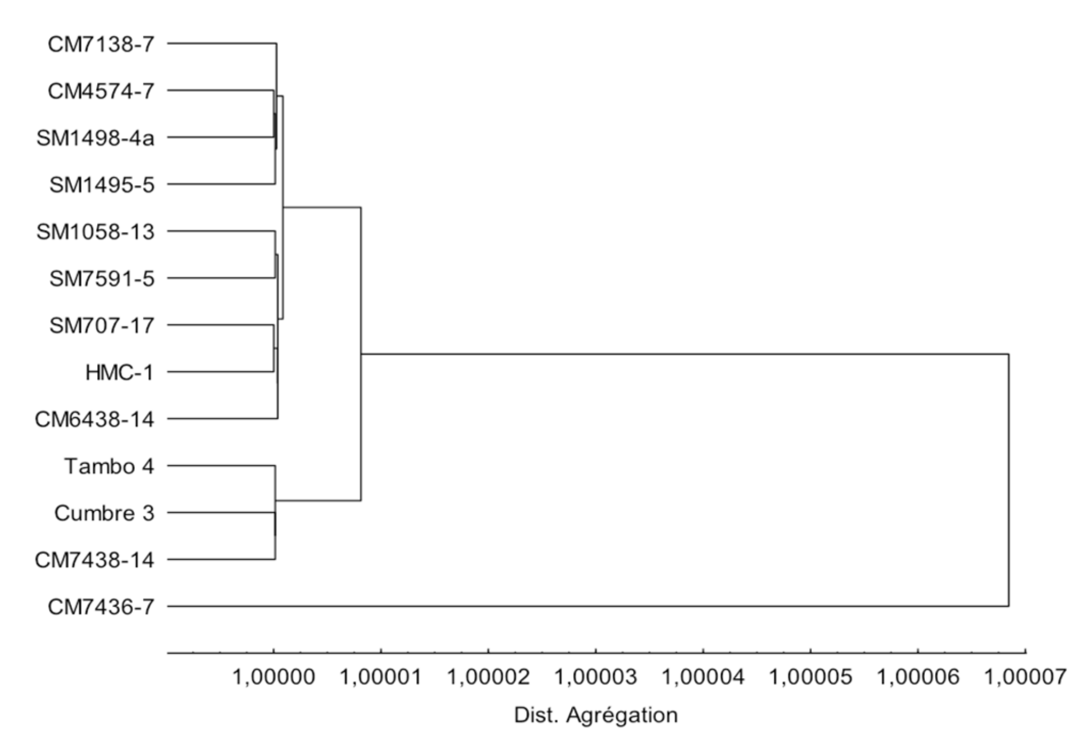


Figure 47. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les teneurs en groupements carbonyle des variétés soumises au traitement FS.

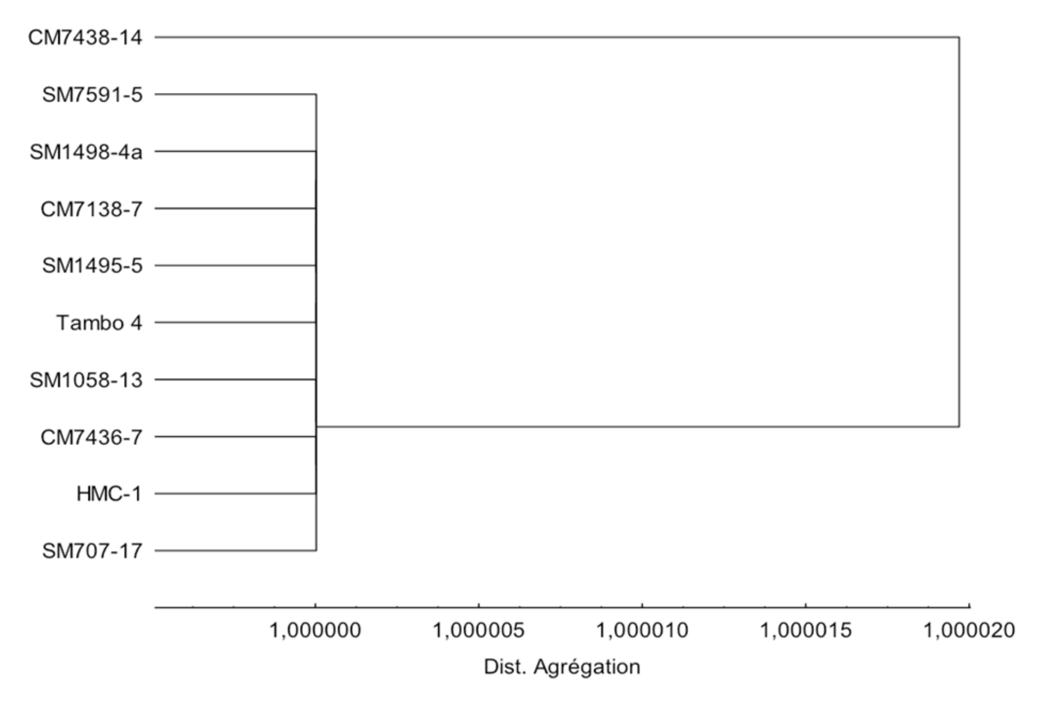


Figure 48. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les teneurs en groupements carboxyle des variétés lors de la différence entre les traitements FS et NO.

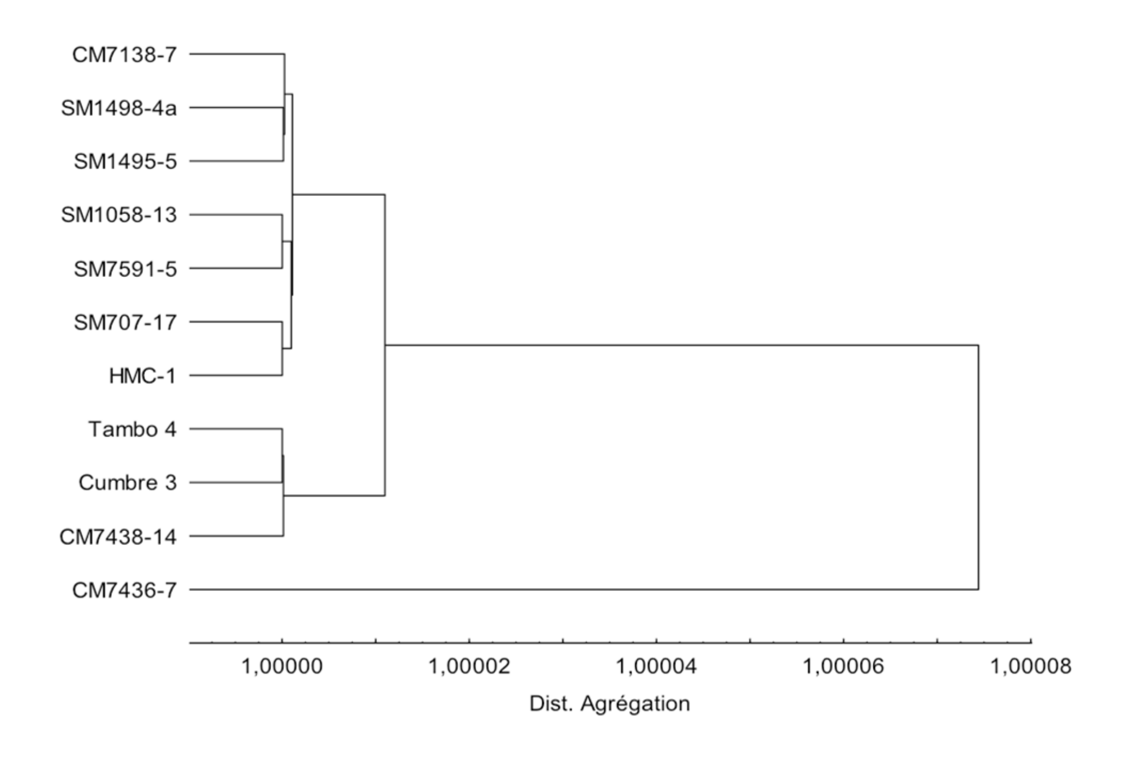


Figure 49. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre l'oxydation total (CO+COOH) des différentes variétés.

4.1.2.3. Analyse structurale par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR).

Objectif.

Montrer l'effet des traitements, des variétés et de l'altitude des échantillons analysés sur le degré d'ordre dans le granule d'amidon.

Analyse des résultats.

13 échantillons soumis aux traitements NO, NS, FO et FS ont été analysés par la méthode ATR-FTIR.

Les spectres infrarouge ont été étudiés dans le domaine 800 cm^{-1} – 1200 cm^{-1} essentiellement associé aux vibrations des groupements C-O et C-H et représenté par une superposition de nombreux signaux. Dans cette région, nous trouvons les bandes à 1045 cm^{-1} et 1018 cm^{-1}, associées respectivement aux structures ordonnée et amorphe de l'amidon (Grosmaire *et al.*, 2013; Van Soest *et al.*, 1995), et la bande à 996 cm^{-1}, reliée à la structure cristalline et sensible à l'hydratation (Mutungi *et al.*, 2011; Van Soest *et al.*, 1995).

Les ratios des surfaces des bandes de vibrations 1045/1018 cm^{-1} et 996/1018 cm^{-1} ont été calculés après déconvolution spectrale dans ce domaine : le spectre expérimental est décomposé en une somme de fonctions gaussiennes et lorentziennes qui correspondent aux différentes bandes de vibration. Chaque bande est constituée de quatre paramètres

variables : position, intensité, largeur à mi-hauteur et rapport gaussien/lorentzien. La variation des divers paramètres permet d'ajuster le spectre calculé au spectre expérimental (cf. **Figure 50**).

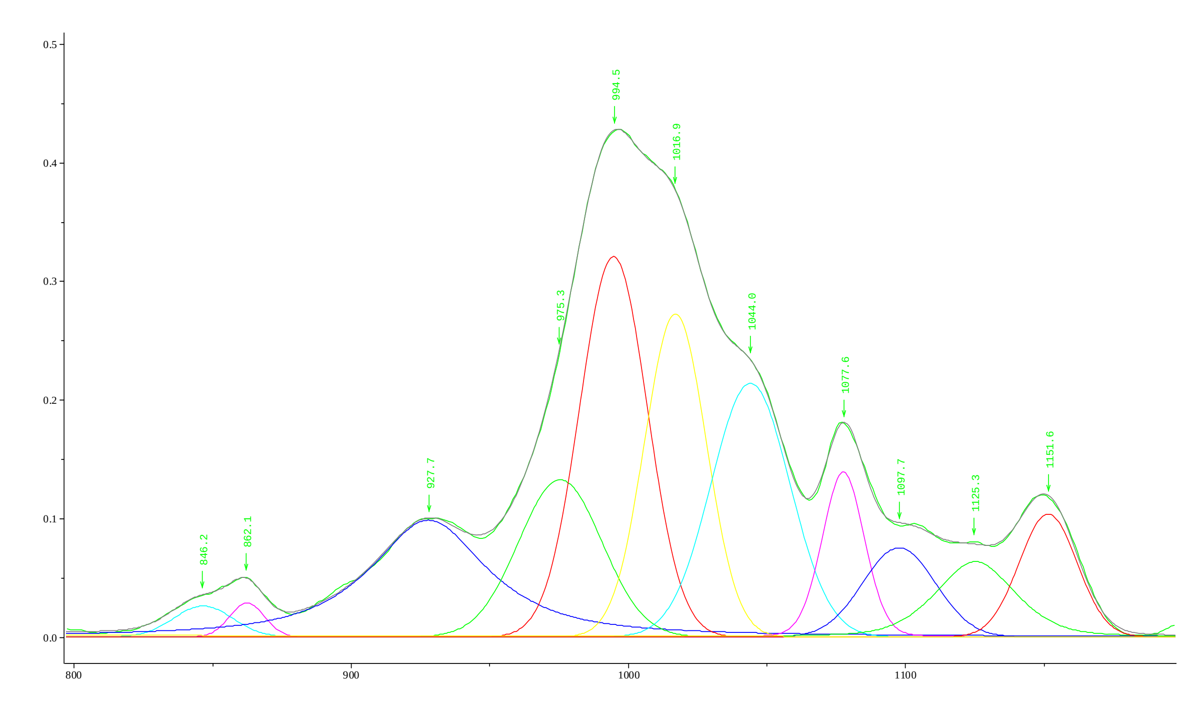


Figure 50. Ajustement du spectre calculé au spectre expérimental pour la variété SM7591-5 (moyenne des 4 traitements).

Le **Tableau 20** rassemble les ratios des surfaces des bandes de vibrations 1045/1018 cm^{-1} et 996/1018 cm^{-1}, représentatifs du degré d'ordre moléculaire (Mutungi *et al.*, 2011).

Ces ratios à 1045/1018 cm^{-1} et 996/1018 cm^{-1} sont respectivement compris entre 0,994 et 1,305 pour les génotypes non modifiés (NO). Les résultats trouvés sont en accord avec la littérature : une étude sur l'amidon de manioc natif (Mina *et al.*, 2011) a estimé le ratio 1047/1022 cm^{-1} à 0,991. Par ailleurs, une étude sur l'amidon du manioc amorphe (Mutungi *et al.*, 2011) a évalué les ratios 1047/1022 cm^{-1} et 995/1022 cm^{-1} à 0,40 et 0,46, respectivement. Les valeurs de cette dernière étude (Mutungi *et al.*, 2011) sont moins élevées que ceux de nos résultats, car comme les échantillons sont amorphes les ratios 1047/1022 cm^{-1} et 995/1022 cm^{-1} sont plus faibles.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas eu de différences significatives entre les traitements et entre les génotypes de plaine et d'altitude. En conclusion, les analyses réalisées sur les 13 génotypes soumis à 4 traitements (NO, NS, FO et FS) ne permettent pas déterminer un effet dû aux traitements ni à l'altitude de culture dans le degré de cristallinité de l'amidon à une profondeur de pénétration entre 2,6 et 1,7 µm (**Tableau 20**. et ACP non montrés).

Tableau 20

ATR-FTIR des génotypes d'amidon natif, fermentés et/ou séchés au soleil.

Traitement	Ratios d'absorbance IR	
	$1045/1018\ cm^{-1}$ [y]	$996/1018\ cm^{-1}$ [y]
Plaine		
NO [z]	0,988(0,008)[a]	1,303(0,032)[a]
NS [z]	0,992(0,029)[a]	1,304(0,011)[a]
FO [z]	0,994(0,033)[a]	1,293(0,035)[a]
FS [z]	1,002(0,019)[a]	1,334(0,024)[a]
Altitude		
NO [z]	0,976(0,037)[a]	1,293(0,032)[a]
NS [z]	0,995(0,022)[a]	1,305(0,021)[a]
FO [z]	0,987(0,014)[a]	1,310(0,037)[a]
FS [z]	0,991(0,022)[a]	1,321(0,030)[a]
Tous		
NO [z]	0,994(0,023)[a]	1,305(0,019)[a]
NS [z]	0,989(0,018)[a]	1,306(0,036)[a]
FO [z]	0,994(0,021)[a]	1,324(0,028)[a]
FS [z]	0,979(0,032)[a]	1,295(0,031)[a]

[y] Valeurs obtenues à partir des déconvolutions spectrales.

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four et FS : fermenté, séché au soleil.

[a] Les lettres différentes, dans chaque colonne, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).
Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

4.1.3. Structure supramoléculaire des amidons : propriétés des granules

4.1.3.1. Microscopie électronique.

Objectif.

Visualiser l'aspect de la surface des granules d'amidon suite aux traitements natif et de fermentation. Tester l'hypothèse selon laquelle le traitement de fermentation attaque différemment la surface des granules d'amidon des génotypes de plaine et d'altitude.

Analyse des résultats.

Les techniques de microscopie électronique au balayage (MEB) et environnementale (EMEB) ont été utilisées pour les observations des échantillons.

Les échantillons non fermentés, séchés au four (NO) et fermentés, séchés au four (FO) ont été examinés. Ceci afin de vérifier l'effet de la fermentation sur les modifications éventuelles de la surface du granule.

Les échantillons analysés sont les suivants :

- Pour la MEB, 8 génotypes ont été sélectionnés :
  A. 3 génotypes de plaine (HMC-1, CM6438-14 et CM4574-7) et,
  B. 5 génotypes d'altitude (Cumbre 3, SM707-17, Tambo 4, SM1058-13 et SM7591-5).
- Pour la EMEB, 5 génotypes ont été sélectionnés :
  C. 2 génotypes de plaine (CM6438-14 et CM4574-7) et,
  D. 3 génotypes d'altitude (CM7438-14, Cumbre 3 et SM1058-13).

En vue d'éliminer d'une part les contraintes mécaniques de broyage (manuel au mortier) et d'autre part le plaquage métallique, qui auraient pu masquer les pores et fissures formés lors la fermentation, des analyses préliminaires MEB sans broyage et EMEB ont été effectuées. Les résultats montrent à priori que ni le broyage manuel ni le plaquage ne modifient la porosité ou l'aspect lisse des granules.

Taille des granules.

La taille moyenne des granules estimée par ces deux techniques, est 15 µm, en accord avec les résultats d'autres auteurs (Moorthy, 2002, 2004; Niba *et al.*, 2002; Onitilo *et al.*, 2007) (**Figure 51 et 52**). Aucune différence significative de taille n'a été observée entre les différents génotypes (Moorthy & Maini, 1982) et entre les différents traitements (NO et FO). On peut noter cependant que la granulométrie par diffraction laser donne des résultats plus fiables en ce qui concerne la taille des granules.

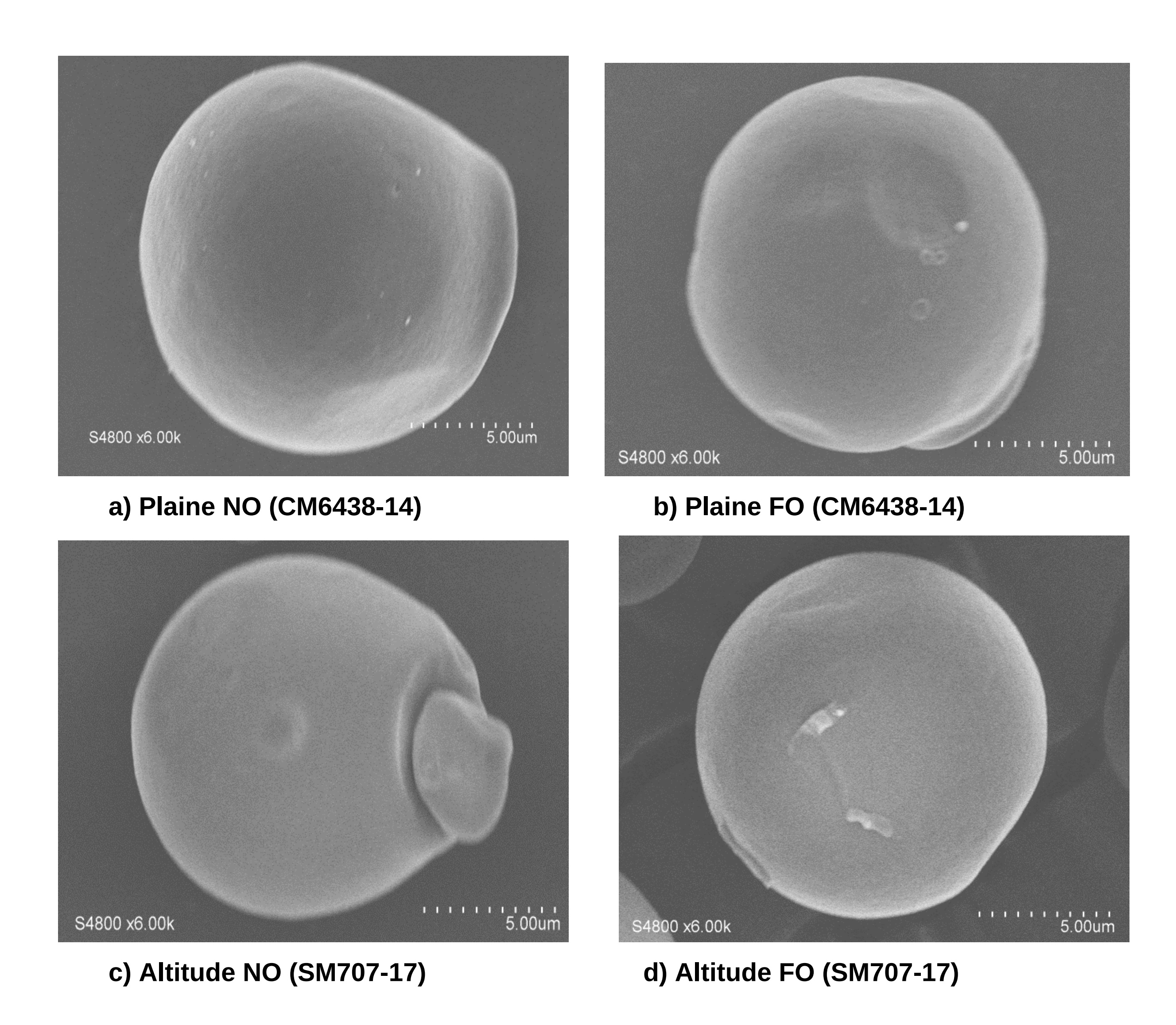
Morphologie des granules.

Comme observé par d'autres auteurs, les granules d'amidon de manioc présentent des formes rondes (Ciacco & D'Appolonia, 1977; Moorthy, 2002; Rickard *et al.*, 1991; Swinkels, 1985) ou ovales (Moorthy, 2002, 2004; Niba *et al.*, 2002; Onitilo *et al.*, 2007) (**Figure 51 et 52**). Aucune différence morphologique entre génotypes ou traitements n'a été observée.

En revanche, des travaux antérieurs sur des granules d'amidon aigre, obtenus après fermentation et séchage au soleil, ont montré des modifications de la morphologie (environ 10%) par rapport à l'amidon de manioc « doux » ou natif (Cárdenas & de Buckle, 1980).

Apparence de la surface des granules.

La surface des granules de cette étude apparait lisse, plane et homogène. Aucun endommagement superficiel n'a été observé tant pour les échantillons NO que FO (**Figure 51 et 52**). Ces résultats sont similaires à ceux présentés dans la littérature (Fannon *et al.*, 1992; Moorthy, 2002, 2004; Niba *et al.*, 2002; Onitilo *et al.*, 2007).



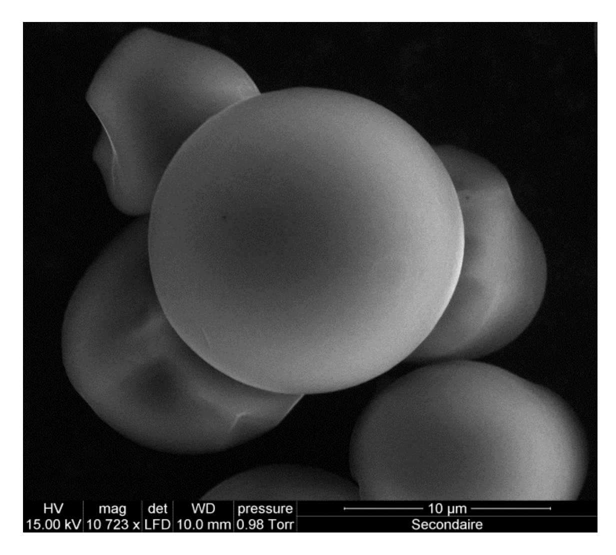
a) Plaine NO (CM6438-14) **b) Plaine FO (CM6438-14)**

c) Altitude NO (SM707-17) **d) Altitude FO (SM707-17)**

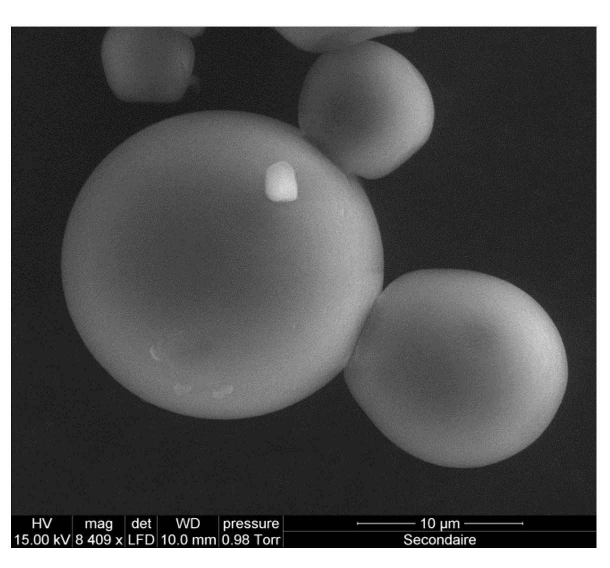
Figure 51. Observations par MEB de 2 génotypes d'amidon du manioc, un de plaine (a-b) et un autre d'altitude (c-d), soumis à deux traitements, non fermenté, séché au four (NO) et fermenté, séché au four (FO) : a) CM6438-14 NO, b) CM6438-14 FO, c) SM707-17 NO d) SM707-17 FO.

Cependant, quelques travaux signalent des dégradations superficielles de moins de 1% des granules ayant subi un traitement de fermentation (Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998). D'autres études (Cárdenas & de Buckle, 1980; Onitilo *et al.*,

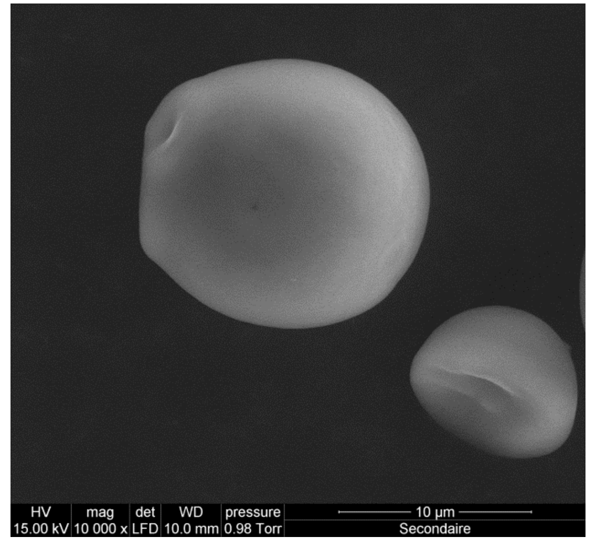
2007) observent également l'apparition de certaines fentes et quelques « piqûres » dans les amidon aigres (après fermentation).



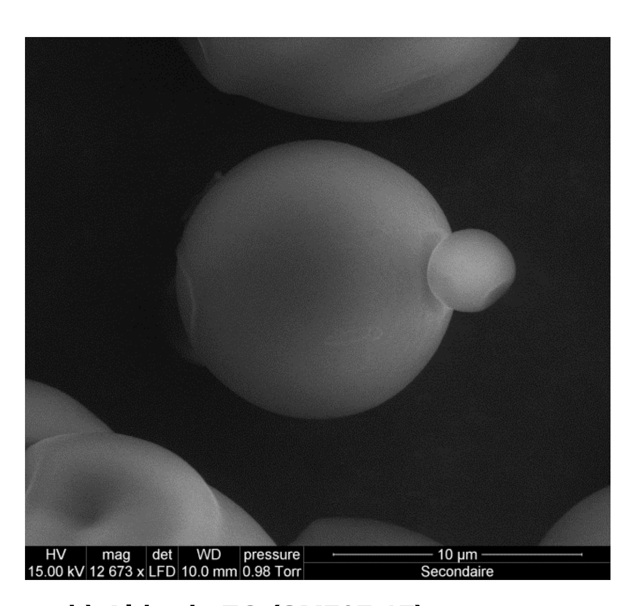
e) **Plaine NO (CM4574-7)**



f) **Plaine FO (CM4574-7)**



g) **Altitude NO (SM707-17)**



h) **Altitude FO (SM707-17)**

Figure 52 Observations par EMEB de 2 génotypes du manioc, un du plaine (e-f) et un autre d'altitude (g-h), soumis à deux traitements : non fermenté, séché au four (NO) et fermenté, séché au four (FO) : e) CM4574-7 NO, f) CM4574-7 FO, g) SM707-17 NO et h) SM707-17 FO.

En conclusion, les observations par microscopie électronique n'ont pas montré d'indices de dégradation de la surface du granule d'amidon lors de la fermentation de nos différents échantillons.

4.1.3.2. Taille des granules.

Objectifs.

Mettre en évidence les différences de taille des granules des échantillons de plaine et d'altitude en fonction des traitements.

Analyse des Résultats.

Le diamètre des granules (D [4,3]) des 52 échantillons (13 génotypes soumis aux traitements natifs, fermentés et/ou séchés au soleil) est compris entre 12,9 à 16,1 µm (**Tableau 21**). Ces résultats sont en conformité avec la littérature (Defloor, Dehing, & Delcour, 1998; Huang, Lu, Li, & Tong, 2007; Niba *et al.*, 2002; Nuwamanya, Baguma, Emmambux, & Taylor, 2010; Onitilo *et al.*, 2007; Sriroth *et al.*, 1999).

A l'état natif (NO), les échantillons de plaine ont des granules légèrement plus grands que ceux d'altitude, avec D [4,3] égal à 15,3 µm et 14,5 µm, respectivement.

A partir de ces résultats, nous avons calculé le pourcentage de diminution des tailles de granule après les traitements NS, FO et FS (**Tableau 21**). Pour les génotypes de plaine, les traitements NS, FO et FS entrainent la diminution de 4,6 ; 9,1 et 8,9%, respectivement, par rapport au NO, alors que, dans les génotypes d'altitude, ces traitements n'ont pas d'influence sur le diamètre des granules. D'autre part, pour les génotypes de plaine, la fermentation a un effet plus marqué que le séchage, autant pour le traitement FO que pour le traitement FS.

Cette différence de sensibilité des granules d'amidon à la fermentation selon l'origine géographique semble indiquer deux modes d'hydrolyse différents :

Dans les génotypes de plaine, les traitements NS, FO et FS attaqueraient préférentiellement les couches externes des granules, avec par conséquence une diminution de la taille des granules, tout en maintenant intacts les noyaux de ces granules.

En revanche, dans les génotypes d'altitude, la fermentation attaquerait de façon homogène les couches externes et la structure interne des granules, ce qui entraînerait l'affaiblissement des granules, mais pas une réduction significative de leur diamètre.

Par ailleurs, aucun effet variétal n'a été constaté sur les échantillons natifs (NO), la variation de la taille des granules entre variétés est négligeable (**Tableau 21**). En revanche, Niba *et al.* (2002), Onitilo *et al.* (2007) et Moorthy, Wenham, & Blanshard (1996) ont trouvé une variabilité importante entre 9 – 20, 14 – 18 et 10 – 20 µm respectivement analysant 11, 6 et 5 génotypes différents d'amidon de manioc natif.

Tableau 21

Taille des granules des amidons de manioc natif, fermenté et/ou séché au soleil

Génotypes	Taille de granules (D[4,3]) (μm) ^{y}				Diminution de la taille granulaire NO Vs d'autres traitements (%)		
	Traitement ^{z}						
	NO	NS	FO	FS	NO Vs NS	NO Vs FO	NO Vs FS
Plaine							
HMC-1	15,95(0,00)$^{l\ D}$	15,07(0,00)$^{k\ C}$	14,61(0,00)$^{k\ B}$	14,30(0,01)$^{e\ A}$	5,52	8,40	10,37
CM6438-14	14,20(0,01)$^{e\ D}$	13,18(0,02)$^{a\ C}$	12,92(0,00)$^{a\ B}$	12,91(0,00)$^{a\ A}$	7,16	8,99	9,06
CM4574-7	15,85(0,00)$^{k\ D}$	15,69(0,00)$^{l\ C}$	14,27(0,00)$^{e\ A}$	14,70(0,00)$^{h\ B}$	1,01	9,97	7,26
Altitude							
CM7436-7	13,96(0,01)$^{b\ D}$	13,88(0,00)$^{b\ C}$	13,42(0,00)$^{b\ B}$	13,20(0,01)$^{b\ A}$	0,60	3,89	5,49
CM7438-14	14,06(0,00)$^{c\ A}$	14,15(0,00)$^{c\ B}$	14,60(0,00)$^{j\ C}$	14,32(0,00)$^{f\ D}$	-0,64	-3,84	-1,85
SM14984a	15,79(0,01)$^{j\ B}$	16,12(0,02)$^{m\ D}$	14,63(0,00)$^{l\ A}$	15,92(0,00)$^{k\ C}$	-2,11	7,33	-0,84
CM7138-7	14,71(0,01)$^{g\ D}$	14,45(0,01)$^{g\ B}$	14,33(0,01)$^{h\ A}$	14,49(0,00)$^{g\ C}$	1,77	2,58	1,52
SM7591-5	14,97(0,00)$^{i\ D}$	14,79(0,00)$^{i\ C}$	14,59(0,00)$^{i\ B}$	14,49(0,01)$^{g\ A}$	1,20	2,54	3,23
Cumbre 3	14,09(0,01)$^{d\ B}$	14,40(0,01)$^{f\ C}$	13,84(0,00)$^{c\ A}$	15,16(0,00)$^{j\ D}$	-2,20	1,80	-7,57
SM707-17	13,91(0,00)$^{a\ A}$	14,35(0,00)$^{e\ D}$	13,97(0,00)$^{d\ B}$	14,06(0,00)$^{d\ C}$	-3,16	-0,43	-1,08
SM1495-5	13,96(0,00)$^{b\ B}$	14,26(0,00)$^{d\ C}$	14,32(0,00)$^{g\ D}$	13,82(0,00)$^{c\ A}$	-2,15	-2,58	1,00
SM1058-13	14,96(0,00)$^{h\ C}$	14,96(0,00)$^{j\ C}$	14,68(0,00)$^{m\ A}$	14,73(0,00)$^{i\ B}$	0,00	1,87	1,54
Tambo 4	14,48(0,00)$^{f\ C}$	14,64(0,00)$^{h\ D}$	14,28(0,00)$^{f\ A}$	14,30(0,00)$^{e\ B}$	-1,10	1,38	1,24
Plaine	15,33(0,85)^{C}	14,65(1,13)^{B}	13,93(0,77)^{A}	13,97(0,81)^{A}	4,56(3,19)^{P}	9,12(0,79)^{Q}	8,89(1,56)^{Q}
Altitude	14,49(0,59)^{A}	14,60(0,60)^{A}	14,27(0,40)^{A}	14,45(0,71)^{A}	-0,78(1,65)^{P}	1,45(3,18)^{Q}	0,27(3,49)^{PQ}
Tous	14,68(0,74)^{C}	14,61(0,74)^{BC}	14,19(0,52)^{A}	14,34(0,75)^{AB}	0,45(3,04)^{P}	3,22(4,36)^{Q}	2,26(4,88)^{Q}

^{y} Valeurs obtenues par diffractométrie lasser.

^{z} Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FO : fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FS : fermenté, séché au soleil.

$^{a-m}$ Les lettres minuscules différentes, dans chaque colonne, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher). Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

$^{A-D;\ P-Q}$ Les lettres majuscules différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher). Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

4.1.3.3. Cristallinité par diffraction aux rayons X.

Objectif.

Confirmer que les traitements de fermentation et/ou séchage n'altèrent pas la cristallinité des d'amidons de manioc.

Analyse de résultats.

5 échantillons ont été sélectionnés : 1 de plaine (CM4574-7 NO) et 4 d'altitude (SM1058-13 NO, Cumbre 3 NO, Cumbre 3 FO et Cumbre 3 FS). L'échantillon de plaine (HMC-1 NO) a déjà été analysé dans le travail de Rolland-Sabaté *et al.* (2012), et a été inclus dans les résultats.

Les diagrammes de diffraction aux rayons X (DRX) des échantillons sont présentés dans la **Figure 53**. Seul le génotype HMC-1 n'est pas représenté ici.

L'analyse de l'ensemble des échantillons a montré une cristallinité relative comprise entre 35 et 40% quels que soient les traitements. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec de l'amidon natif de même provenance (CIAT-Colombie) (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012).

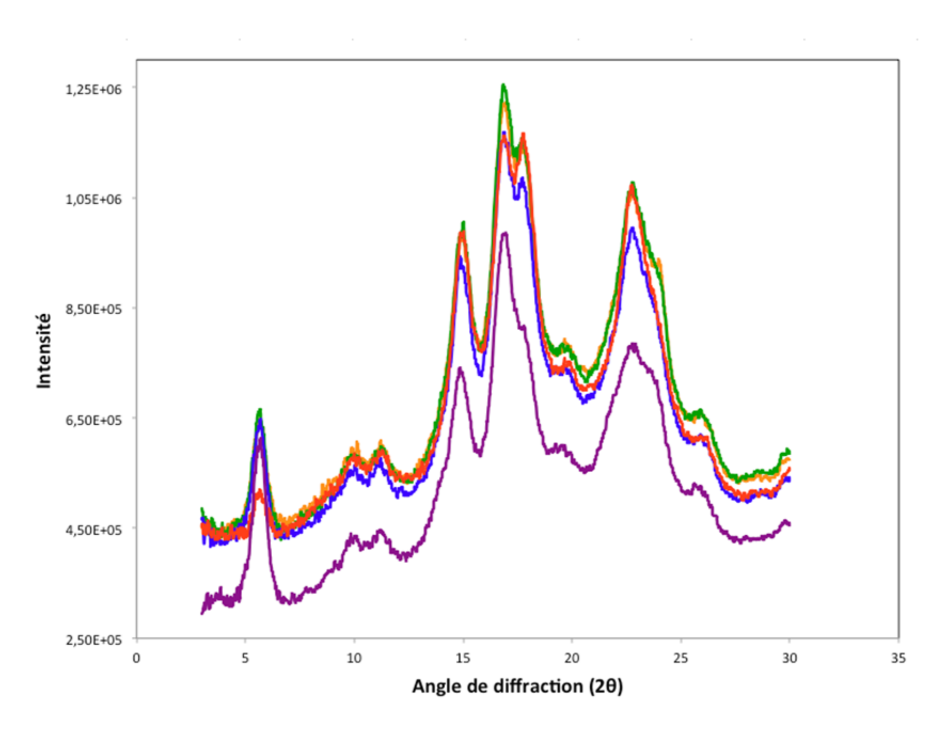


Figure 53. Diffractogramme de rayons X des amidons de manioc. CM4574-7 (plaine) NO en rouge, SM1058-13 (altitude) NO en violet et Cumbre 3 (altitude) NO, FO et FS respectivement en orange, vert et bleu.

L'échantillon Cumbre 3 soumis aux traitements NO, FO et FS présente un pourcentage de cristallinité identique de 40% quel que soit le traitement effectué (NO, FO et

FS). Certains auteurs (Putri, Haryadi, Marseno, & Cahyanto, 2012), utilisant un traitement de fermentation, ont observé une réduction de la cristallinité relative de 6,4 à 8,6% après fermentation.

Nos résultats comparés à ceux de la littérature montrent l'importance des différents protocoles de préparation des échantillons sur la cristallinité

Cristallinité relative.

Les résultats des analyses de cristallinité par DRX sont indiqués dans le **Tableau 22**.

Tableau 22

Cristallinité des amidons de manioc natifs et fermentés et/ou séchés au soleil.

Génotype	Traitement [x]	% Cristallinité relative [y]	% A [y]	% B [y]
Plaine				
HMC-1 [z]	NO	35	85	15
CM4574-7	NO	35	90	10
Altitude				
SM1058-13	NO	35	40	60
Cumbre 3	NO	40	85	15
Cumbre 3	FO	40	85	15
Cumbre 3	FS	40	85	15

[x] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FO : fermenté, séché au four et FS : fermenté, séché au soleil.

[y] Valeurs obtenues par DRX.

[z] Echantillon analysé dans le travail de Rolland-Sabaté *et al.* (2012).

Type cristallin.

Les diffractogrammes présentés sur la **Figure 53** sont caractéristiques de structures cristallines de type C. Cette forme cristalline présente des pics de diffraction intenses à 5,6°; 15°; 17°; 18° et 23°.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de plusieurs auteurs :

- Bertolini *et al.* (2001) ont observé des diffractogrammes caractéristiques des structures de type C avec des bandes intenses à 15°; 17° ; 18,1° ; 22° ; 23,3° et 24° pour des échantillons de manioc soumis à différents traitements (natif, acidifié et/ou irradié).

- Camargo, Colonna, Buleon, & Richard-Molard (1988) ont observé sur des diffractogrammes d'amidons de manioc natifs et fermentés les pics les plus intenses à 5,65°; 15°; 17°, 18° correspondant à un mélange des types A et B (assimilé à du type C).

- Plata-Oviedo & Camargo (1998) ont observé des bandes intenses à 15° ; 17° ; 18° ; et 22,5° correspondant au type C, pour les échantillons de manioc natifs et séchés au soleil.

Une équipe, Putri, Haryadi, Marseno, & Cahyanto (2012), a observé des diffractogrammes de type A avec les pics intenses à 15° ; 17° ; 18° ; et 23° pour des échantillons d'amidon de manioc natif, acidifié ou fermenté.

Dans notre étude, les échantillons analysés présentent des degrés de cristallinité similaires entre 35 et 40%. De plus, il n'y a aucune influence des traitements FO et FS sur la cristallinité par rapport aux amidons natifs.

Tous les échantillons présentent un mélange des types A et B avec une majorité de type A (85-90%) en accord avec la littérature. Rolland-Sabaté *et al.* (2012, 2013) ont également identifié un type cristallin C avec des proportions similaires (valeurs comprises entre 85-75% de type A et 15-25% de type B) pour des génotypes de la même provenance (CIAT, Colombie). Asaoka, Blanshard, & Rickard (1991) qui ont également analysé des variétés de la même provenance (CIAT, Colombie) ont de même identifié un type cristallin C. Une attention particulière doit être apportée à l'échantillon SM1058-13 qui présente un pourcentage de cristallinité relative de 35% et des proportions de type A et B respectivement de 40 et 60%, différentes des autres échantillons. Cette différence est probablement d'origine génétique, cependant la base de données du CIAT n'a pas permis pour l'instant d'apporter plus d'informations.

L'examen des diffractogrammes du génotype Cumbre 3 ayant subi les traitements NO, FO et FS ne met en évidence aucune différence. Les traitements n'influent donc pas sur la structure cristalline de cet échantillon.

Ces résultats sont conformes à ceux reportés dans la littérature : le type de modèle cristallin n'est pas influencé par la fermentation (Camargo *et al.*, 1988), par la fermentation et/ou irradiation (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001), par les traitements d'acidification ou de fermentation (Putri *et al.*, 2012) ou par les traitements de fermentation et de séchage au soleil (Franco, Cabral, & Tavares, 2002; Marcon *et al.*, 2009)..

Hizukuri (1985) a montré que les différents types de cristallinité sont reliés à la longueur des chaînes linéaires de l'amylopectine. Les amylopectines des amidons HMC-1, CM4574-7 et Cumbre 3 pourraient ainsi contenir des chaînes linéaires de longueur similaire tandis que le génotype SM1058-13 aurait des chaînes plus longues.

En conclusion, les mesures de cristallinité ne font pas apparaitre de différences significatives ni entre les traitements (NO, FO et FS) ni entre les variétés cultivées en plaine ou en altitude. Cependant, ces analyses nous ont permis d'identifier un effet variétal spécifique pour SM1058-13 qui présente un comportement différent des autres génotypes.

4.1.4. Propriétés thermiques

Objectif.

Déterminer les températures et les enthalpies de gélatinisation des différents échantillons. Montrer l'influence variétale et géographique sur ces propriétés thermiques.

Analyse des résultats.

Les paramètres DSC sont reliés à la cohésion de la structure du granule d'amidon, à sa dégradation et à sa structure cristalline (Marcon *et al.*, 2007; Mestres & Rouau, 1997; Nwokocha *et al.*, 2009).

L'analyse DSC a porté principalement sur les échantillons non fermentés séchés au four (NO). Une étude préliminaire sur 10 échantillons fermentés et séchés au soleil (FS) indique que ce traitement tend à diminuer légèrement la température d'onset T_o (-0,9°C en moyenne), et de façon plus prononcée l'enthalpie de gélatinisation ΔH (-2,60 J/g en moyenne). Cependant la variabilité entre échantillons, en particulier pour ΔH, n'a pas permis de conclure fermement sur l'effet des traitements sur la gélatinisation. En effet, selon les échantillons, l'enthalpie ΔH a diminué ou augmenté, ce qui peut indiquer différents mécanismes de dégradation : Dans le premier cas (diminution de ΔH), les parties cristallines ont pu être endommagées en majorité, et dans le second cas (augmentation de ΔH), les parties amorphes ont pu être endommagées en majorité, se traduisant par une augmentation apparente de ΔH.

Les températures de gélatinisation (T_o, T_p et T_c), la plage de température de gélatinisation (T_c - T_o) et l'enthalpie de gélatinisation (ΔH) sont regroupées dans le **Tableau 23**. Ces valeurs sont comparables avec la littérature (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 1997; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997; Nwokocha *et al.*, 2009).

Dans notre étude les températures moyennes de gélatinisation sont légèrement inférieures à celles de la littérature (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009; Mestres & Rouau, 1997; Nwokocha *et al.*, 2009), avec T_o, T_p et T_c respectivement à 58,6 ; 63,3 et 69,7°C.

La plage de température de gélatinisation (T_c - T_o) a été inférieure à celle trouvée dans la littérature. Cette plage a été considérée étroite (environ 11°C) en comparaison à la littérature d'environ 14°C (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012) et 20°C (Putri, Haryadi, & Marseno and Cahyanto, 2011), ce qui suggère la présence de cristallites homogènes (en terme de stabilité et de taille) dans les granules d'amidon (Putri *et al.*, 2011).

La ΔH moyenne (17,0 J/g) est similaire à la ΔH relevée dans la littérature (16,5 J/g (Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Mestres & Rouau, 1997)).

Tableau 23

Propriétés thermiques des amidons natifs (NO).

Génotype	Propriétés thermiques				
	$T_o{}^y$ (°C)	$T_p{}^y$ (°C)	$T_c{}^y$ (°C)	ΔH (J g^{-1})	ΔT (°C)
Plaine					
HMC-1	61,64(0,66)^{h}	66,24(0,59)^{f}	72,08(0,25)^{e}	15,28(1,73)^{a}	10,45(0,40)^{a}
CM6438-14	61,07(0,39)^{gh}	65,51(0,32)^{ef}	71,78(1,51)^{e}	16,50(2,87)^{a}	10,72(1,12)^{a}
CM4574-7	61,39(0,42)^{h}	66,10(0,21)^{f}	72,03(0,80)^{e}	17,77(1,10)^{a}	10,64(0,89)^{a}
Altitude					
CM7436-7	57,38(0,64)^{bcd}	61,83(0,78)^{cb}	67,73(1,47)^{ab}	17,67(0,82)^{a}	10,35(1,21)^{a}
CM7438-14	58,12(0,25)^{cde}	62,75(0,09)^{c}	68,78(1,13)^{bcd}	15,43(0,09)^{a}	10,66(1,39)^{a}
SM1498-4a	56,64(0,21)^{b}	60,86(0,38)^{ab}	66,40(1,58)^{a}	16,47(1,24)^{a}	9,76(1,37)^{a}
CM7138-7	58,69(0,23)^{ef}	64,19(0,30)^{d}	71,95(0,23)^{e}	16,63(2,21)^{a}	13,26(0,00)^{c}
SM7591-5	57,21(0,92)^{bc}	62,14(0,77)^{c}	68,29(1,11)^{abc}	17,07(2,71)^{a}	11,08(0,38)^{ab}
Cumbre 3	59,90(0,23)^{fg}	64,70(0,78)^{de}	71,03(1,00)^{de}	16,91(0,46)^{a}	11,13(0,78)^{ab}
SM707-17	58,44(0,08)^{de}	62,76(0,06)^{c}	70,11(1,51)^{cde}	16,82(2,29)^{a}	11,67(1,43)^{abc}
SM1495-5	57,54(0,85)^{bcde}	62,07(0,98)^{c}	68,81(0,57)^{bcd}	16,93(0,19)^{a}	11,27(1,42)^{abc}
SM1058-13	54,77(1,01)^{a}	60,26(0,53)^{a}	67,59(0,41)^{ab}	18,54(0,24)^{a}	12,83(0,60)^{bc}
Tambo 4	57,22(0,57)^{bcd}	62,06(0,48)^{c}	68,76(0,74)^{abcd}	17,09(0,53)^{a}	11,54(0,18)^{abc}
Plaine	61,37(0,45)^{b}	65,99(0,42)^{b}	71,98(0,79)^{b}	16,83(1,83)^{a}	10,61(0,74)^{a}
Altitude	57,56(1,35)^{a}	62,33(1,34)^{a}	68,86(1,81)^{a}	16,99(1,38)^{a}	11,30(1,26)^{a}
Tous	58,58(2,08)	63,30(2,01)	69,69(2,12)	16,95(1,48)	11,11(1,17)

^{y} Valeurs obtenues à partir d'une analyse de DSC : T_o : température initiale de gélatinisation; T_p : température du pic de gélatinisation ; T_c : température finale de gélatinisation.
$^{a-h}$ Les lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).
Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

L'enthalpie de gélatinisation (ΔH) ne montre pas de différences statistiquement significatives entre les génotypes de plaine et d'altitude.

Les températures de gélatinisation : T_o, T_p et T_c des génotypes de plaine ont des valeurs significativement supérieures à ceux d'altitude (respectivement 3,8; 3,7 et 3,1°C) (c.f. **Tableau 23**). Ces paramètres pourraient donc être utilisés pour différencier les génotypes de plaine de ceux d'altitude.

Le test de Fisher du **Tableau 23** et l'analyse cluster (**Figure 54**) indiquent d'une part, une variabilité importante des paramètres DSC en fonction du génotype et d'autre part, une nette différence entre génotypes de plaine et d'altitude.

De plus, cette analyse montre que les cinq meilleurs génotypes panifiables (CM7138-7, Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5 et Tambo 4) sont organisés en deux groupes voisins. Il

semble donc que l'information sur la capacité de panification puisse être liée aux paramètres DSC.

Un échantillonnage plus important serait nécessaire pour confirmer ces résultats.

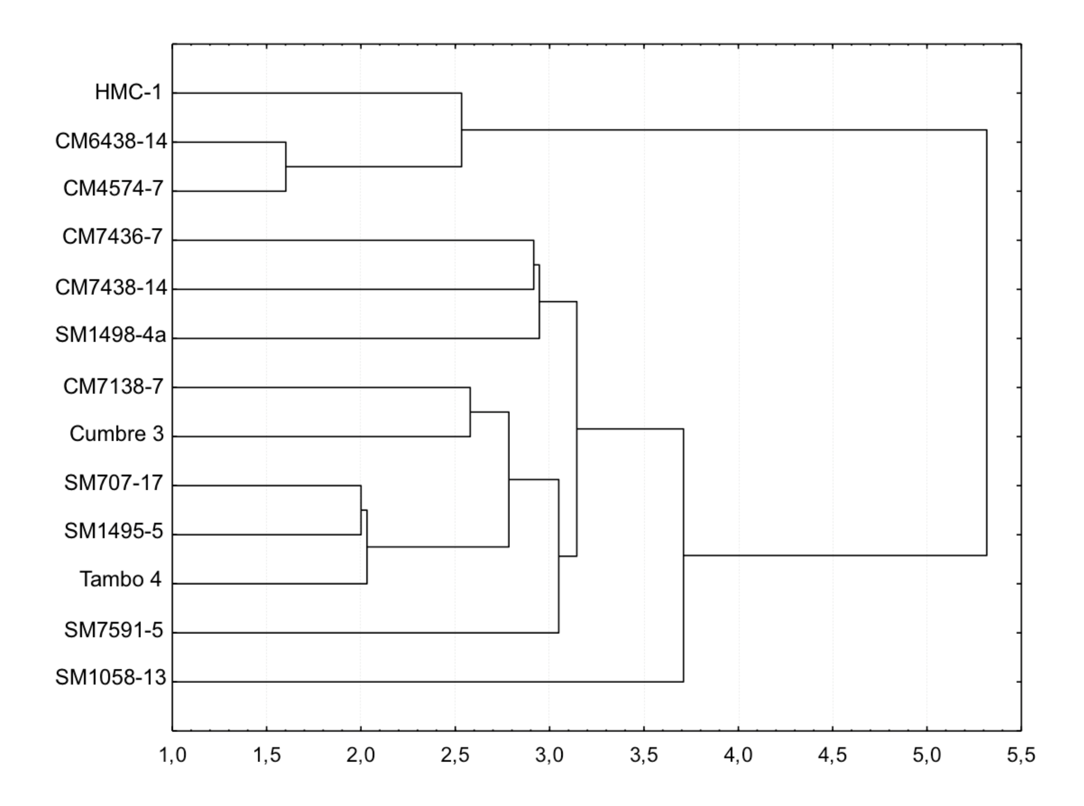


Figure 54. Analyse typologique multivariée des données groupées identifiant les similitudes et différences des paramètres DSC (T_o, T_p et T_c et ΔH) entre les treize génotypes d'amidon du manioc natif (NO).

4.1.5. Conclusion partielle : Caractérisation physico-chimique et structurelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil

Au niveau moléculaire, deux différences notables entre variétés de plaine et d'altitude ont été identifiées. D'une part les variétés de plaine ont une teneur en amylose plus élevée que les variétés d'altitude (21,2 et 18,0% en moyenne, respectivement). D'autre part, la température de gélatinisation des variétés de plaine est plus élevée que celle des variétés d'altitude (61,4 et 57,6°C en moyenne, respectivement, pour la température d'onset). En outre, les traitements de fermentation et séchage au soleil ont réduit la taille moléculaire de l'amidon, en accord avec les résultats des travaux antérieurs (Bertolini, Mestres, Colonna, *et al.*, 2001; Marcon *et al.*, 2009). La baisse du pH et l'apparition d'acides organiques au cours de la fermentation suggèrent que le mécanisme de réduction de la taille moléculaire de l'amidon serait une hydrolyse acide partielle.

Au niveau supramoléculaire, la diminution de taille des granules au cours des traitements, notamment la fermentation, s'est révélée différente pour les variétés de plaine et d'altitude. Le diamètre des granules de plaine a diminué (diminution moyenne de 8,9-9,1% après fermentation), alors que celui des granules d'altitude est resté à peu près constant (diminution moyenne de 0,3-1,5% après fermentation).

Cependant, au-delà de ces observations, peu de différences entre variétés et entre traitements ont été mises en évidence. Ainsi la composition chimique des composants mineurs, le degré d'oxydation de l'amidon, la structure cristalline, le degré de cristallinité, et l'aspect de la surface des granules ont été peu ou pas affectés par les traitements. Ces résultats indiquent soit que les différences recherchées ne sont pas présentes dans ces échantillons, soit que ces différences sont faibles et n'ont pas pu être détectées avec les techniques utilisées.

La section suivante présente les propriétés fonctionnelles des amidons natifs et modifiés, et met en évidence comment certaines propriétés physico-chimiques peuvent influencer les propriétés fonctionnelles.

4.2. Caractérisation fonctionnelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil.

4.2.1. Capacité de panification.

Objectif :

L'objectif est de quantifier la capacité de panification des recettes utilisant ou non des lipides, ainsi que de déterminer l'influence des traitements (NO, NS, FO et FS), du génotype et du lieu de culture sur ce paramètre.

4.2.1.1. Formulation avec du HPMC et sans lipides.

La panification a été faite avec 13 échantillons soumis à NO, NS, FO et FS. La tendance générale de la capacité de panification est : NO ≤ NS < FO < FS (**Tableau 24**).

Tableau 24

Capacité de panification des amidons natifs, fermentés et/ou séchés au soleil dans une formulation avec HPMC, sans lipides.

Génotype	Capacité de panification (mL/g)			
	Traitements [z]			
	NO [z]	NS [z]	FO [z]	FS [z]
Plaine				
HMC-1	0,41(0,35)[a A]	1,05(0,09)[a A]	2,83(0,71)[a B]	7,37(1,61)[a C]
CM6438-14	0,24(0,02)[a A]	1,53(0,07)[a A]	3,22(0,10)[ab B]	10,95(0,91)[b C]
CM4574-7	0,12(0,06)[a A]	1,50(0,40)[a B]	2,81(0,04)[a B]	7,72(0,40)[a C]
Altitude				
CM7436-7	5,72(0,17)[ef A]	6,99(0,38)[e B]	7,60(0,58)[c B]	16,41(0,48)[cd C]
CM7438-14	0,64(0,18)[ab A]	3,68(0,39)[b B]	7,69(0,68)[c C]	-
SM1498-4a	0,78(0,07)[ab A]	3,13(0,13)[b B]	4,54(2,31)[b C]	7,30(1,29)[a D]
SM7591-5	0,25(0,02)[a A]	5,02(0,92)[cd C]	2,86(0,48)[a B]	19,97(0,76)[e D]
Cumbre 3	6,31(0,29)[f A]	5,37(0,19)[d A]	8,10(0,23)[c B]	20,78(0,85)[e C]
SM707-17	1,06(0,47)[bc A]	3,77(0,07)[b B]	2,72(0,22)[a B]	16,65(0,11)[d C]
SM1495-5	1,61(0,20)[c A]	3,42(0,12)[b B]	7,41(0,52)[c C]	19,74(1,95)[e D]
SM1058-13	4,46(0,16)[d B]	4,60(0,29)[c B]	2,27(0,40)[a A]	14,23(0,74)[c C]
Tambo 4	5,54(0,67)[e A]	4,62(0,19)[cd A]	8,71(0,81)[c B]	19,72(0,09)[e C]
Plaine	0,28(0,24)[a A]	1,36(0,30)[a A]	2,95(0,38)[a A]	8,49(1,97)[b B]
Altitude	3,21(2,42)[b AB]	4,59(1,28)[b BC]	5,47(2,73)[b C]	16,72(4,75)[b D]
Tous	2,50(2,46) [A]	3,85(1,79) [AB]	4,93(2,63) [B]	14,51(5,57) [C]

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four; FS : fermenté, séché au soleil.

[a-f] Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre colonnes en $p < 0,05$ (Fisher).

[A-D] Les lettres majuscules, indiquent des différences significatives entre rangées en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Par conséquent, la fermentation est un facteur déterminant pour la panification, plus marqué que l'effet du soleil. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Bertolini *et al.*, 2000; Mestres *et al.*, 2000) qui ont mesuré des volumes d'expansion entre 7,5 - 13,1 mL/g pour des amidons natifs, acidifiés, irradiés UV et acidifiés-irradiés UV. La comparaison des variétés de plaine et d'altitude montre que la capacité de panification est en moyenne 96,8% plus élevée pour les génotypes d'altitude, dans le cas du traitement FS.

Les tests de Fisher et analyses « Cluster » (**Figures 55, 56, 57 et 58**) montrent un effet variétal important pour les génotypes d'altitude. Pour les génotypes de plaine, leur nombre réduit (3) rend cette analyse plus délicate.

Un problème de répétabilité s'est posé pour certains échantillons, pour lesquels une croûte superficielle compacte s'est formée pendant la panification dans tous les échantillons et a limité l'expansion.

Dans le but de confirmer la classification obtenue à partir de cette formulation, et de se rapprocher d'une recette de panification réelle, un second protocole de panification faisant intervenir des lipides a été utilisé.

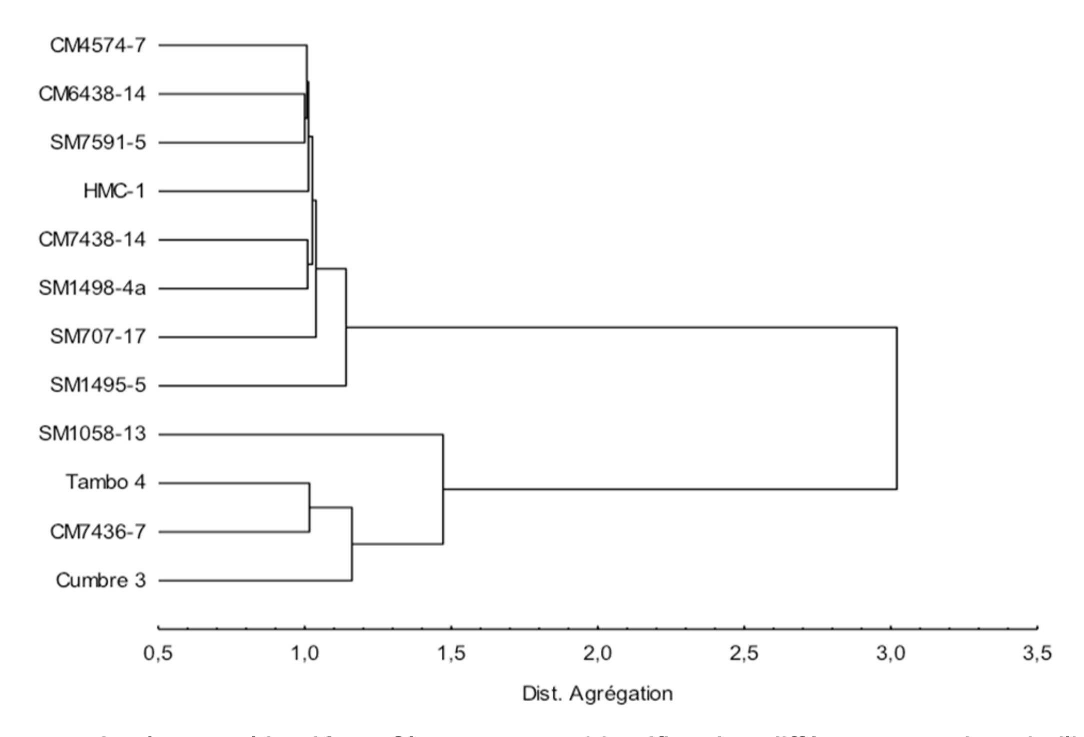


Figure 55. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation avec du HPMC et des lipides des variétés soumises au traitement NO.

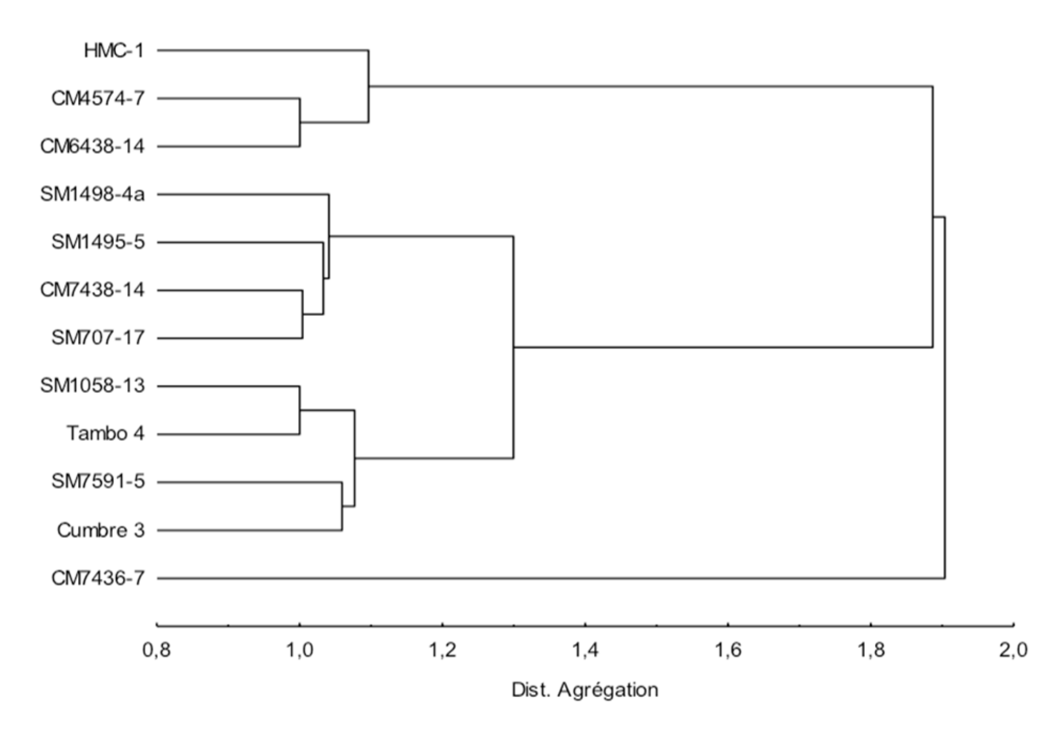


Figure 56. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation avec du HPMC et des lipides des variétés soumises au traitement NS.

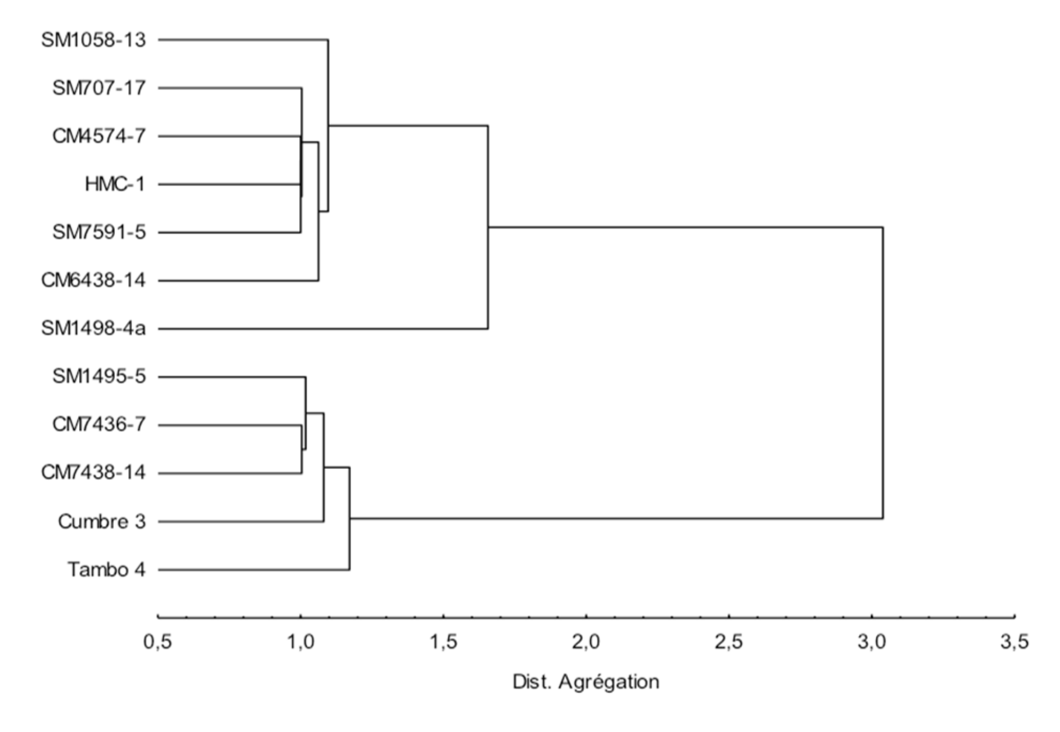


Figure 57. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation avec du HPMC et des lipides des variétés soumises au traitement FO.

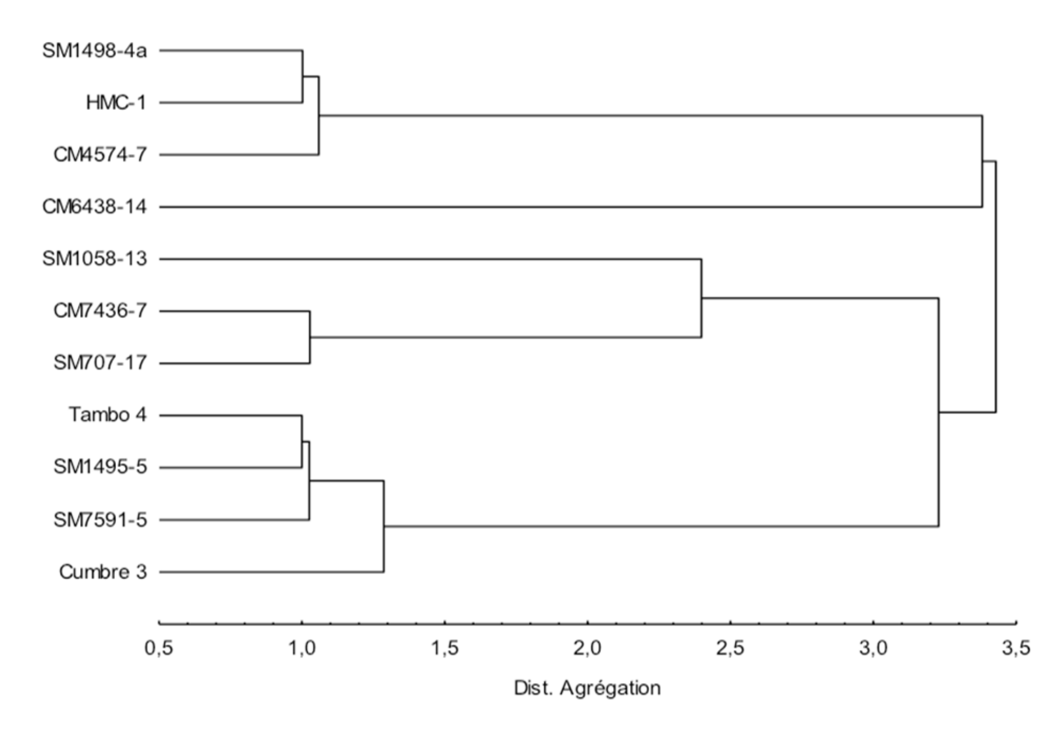


Figure 58. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation avec du HPMC et des lipides des variétés soumises au traitement FS.

4.2.1.2. Formulation boulangère avec prégélatinisation et lipides.

La panification avec cette recette, communément utilisée en Colombie, a été effectuée avec 13 échantillons soumis aux traitements NO, NS, FO et FS.

La tendance générale de la capacité de panification est : NO = FO < NS < FS (**Tableau 25**). Cette séquence est en accord avec la littérature (Bertolini, 2000; Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 2000). Cependant, nos mesures de capacité de panification sont inférieures à celles obtenues par d'autres auteurs (Bertolini *et al.*, 2000; Mestres *et al.*, 2000). Les différences observées pourraient être dues à l'utilisation de différents protocoles de panification et/ou différents traitements des échantillons.

La recette utilisée ici est réalisée avec du fromage « Costeño » contenant des lipides, ce qui rend possible la formation de complexes amylose-lipide. Les capacités de panification observées sont inférieures à celles obtenues sans lipides (formulation HPMC), et pourraient donc s'expliquer par un effet favorable de l'HPMC et/ou la présence des complexes amylose-lipide. En effet, ces complexes inhibent le gonflement de la pâte du pain (Tester & Morrison, 1992). Par ailleurs, des formulations boulangères colombiennes sans addition de lipides panifient mieux, mais au détriment de la qualité gustative.

De manière générale, sur la moyenne des 13 génotypes de plaine et d'altitude, les capacités de panification les plus importantes ont été mesurées pour le traitement FS, avec une augmentation de 221% par rapport au traitement natif (NO). Ainsi l'association fermentation et séchage au soleil est le traitement privilégié pour une meilleure capacité de panification (**Figure 59**).

Tableau 25

Capacité de panification des amidons natifs, fermentés et/ou séchés au soleil dans une formulation boulangère avec lipides.

Génotype	Capacité de panification (mL/g)			
	Traitements ^{z}			
	NO ^{z}	NS ^{z}	FO ^{z}	FS ^{z}
Plaine				
HMC-1	1,40(0,03)$^{a\ A}$	1,93(0,08)$^{b\ B}$	1,40(0,05)$^{a\ A}$	3,57(0,23)$^{ab\ C}$
CM6438-14	1,71(0,04)$^{c\ A}$	1,76(0,05)$^{a\ A}$	1,55(0,05)$^{b\ A}$	4,02(0,35)$^{bc\ B}$
CM4574-7	1,85(0,05)$^{de\ A}$	1,92(0,05)$^{b\ A}$	2,19(0,13)$^{e\ A}$	6,59(0,81)$^{f\ B}$
Altitude				
CM7436-7	1,92(0,05)$^{fgh\ A}$	2,65(0,10)$^{g\ B}$	2,07(0,04)$^{d\ A}$	4,37(0,69)$^{c\ C}$
CM7438-14	1,94(0,06)$^{gh\ A}$	2,11(0,04)$^{c\ AB}$	2,40(0,07)$^{h\ B}$	4,47(0,43)$^{c\ C}$
SM1498-4a	1,82(0,03)$^{d\ A}$	2,26(0,07)$^{d\ A}$	1,94(0,04)$^{c\ A}$	5,99(0,68)$^{e\ B}$
CM7138-7	1,96(0,06)$^{h\ A}$	3,72(0,07)$^{j\ B}$	2,15(0,05)$^{de\ A}$	6,17(0,39)$^{ef\ C}$
SM7591-5	1,45(0,09)$^{b\ A}$	2,40(0,05)$^{e\ B}$	1,49(0,07)$^{b\ A}$	3,05(0,17)$^{a\ C}$
Cumbre 3	2,21(0,13)$^{j\ A}$	3,39(0,15)$^{i\ B}$	2,30(0,15)$^{g\ A}$	8,58(0,79)$^{h\ C}$
SM707-17	1,87(0,05)$^{def\ A}$	2,30(0,06)$^{d\ B}$	2,27(0,07)$^{fg\ B}$	7,49(0,44)$^{g\ C}$
SM1495-5	2,12(0,07)$^{i\ A}$	2,79(0,08)$^{h\ A}$	2,51(0,17)$^{i\ A}$	7,57(1,38)$^{g\ B}$
SM1058-13	1,88(0,02)$^{def\ A}$	2,55(0,07)$^{f\ B}$	2,19(0,09)$^{ef\ AB}$	5,29(0,48)$^{d\ C}$
Tambo 4	2,11(0,07)$^{i\ A}$	2,68(0,08)$^{g\ B}$	2,54(0,07)$^{i\ AB}$	7,92(0,68)$^{g\ C}$
Plaine	1,59(0,21)$^{a\ A}$	1,87(0,10)$^{a\ A}$	1,76(0,38)$^{a\ A}$	4,99(1,51)$^{a\ B}$
Altitude	1,91(0,24)$^{b\ A}$	2,68(0,49)$^{b\ B}$	2,17(0,34)$^{b\ A}$	6,17(1,88)$^{b\ C}$
Tous les génotypes	1,83(0,27)^{A}	2,50(0,55)^{B}	2,07(0,39)^{A}	5,87(1,86)^{C}

^{z} Traitements : NO : non fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four; FS : fermenté, séché au soleil.
$^{a-j}$ Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre colonnes en $p < 0,05$ (Fisher).
$^{A-C}$ Les lettres majuscules indiquent des différences significatives entre rangées en $p < 0,05$ (Fisher).
Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Lorsque l'on considère la moyenne générale de tous les génotypes (**Tableau 25**), le traitement de fermentation (FO) n'améliore pas la capacité de panification par rapport au traitement NO. Des résultats similaires ont été présentés par Demiate *et al.* (2000) où

aucune différence n'a été trouvée entre les amidons de manioc natifs et les amidons traités par 1% d'acide lactique pendant 4 heures. Le traitement d'irradiation solaire seul (NS) améliore la panification de 36,6% par rapport à NO.

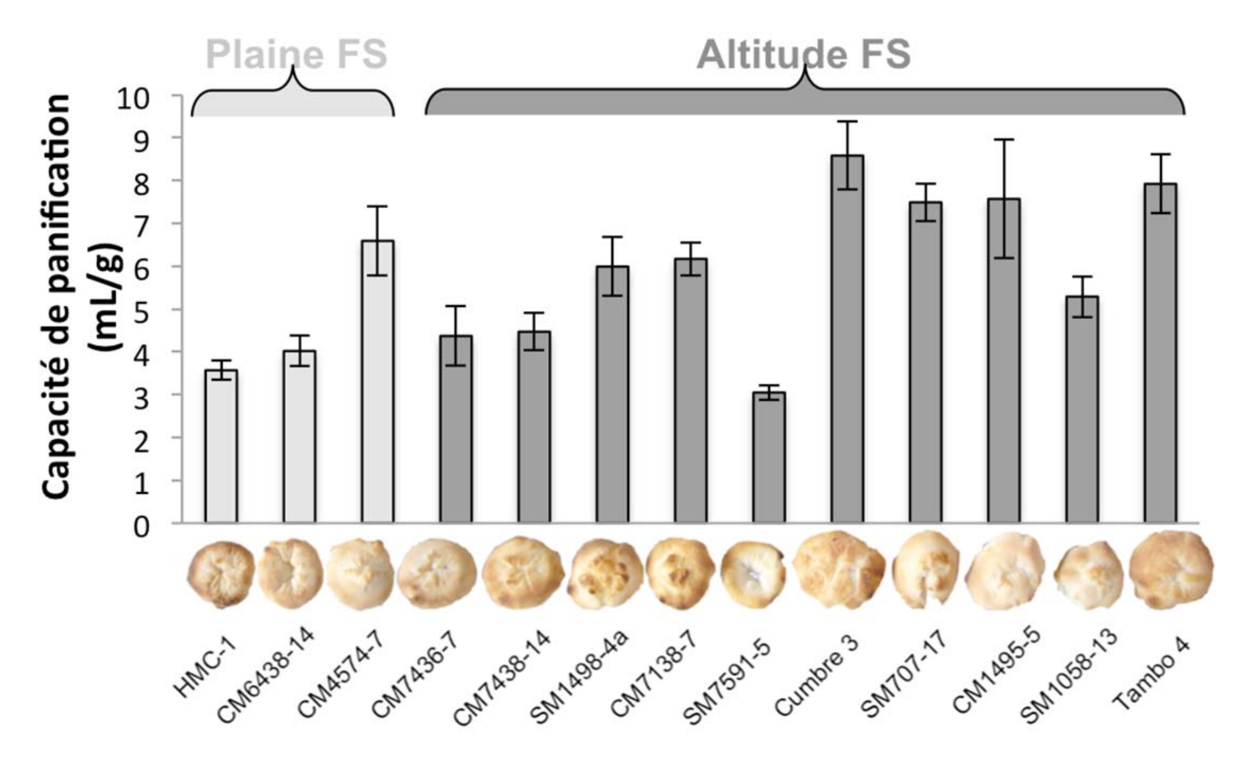


Figure 59. Capacité de panification de 13 génotypes FS (fermentés et séchés au soleil à la « *Rallandería* »)

Quel que soit le traitement, les variétés d'altitude ont des capacités de panification significativement plus élevées que celles de plaine (**Tableau 25**), respectivement 16,8 ; 18,9 ; 30,2 et 19,1% plus élevées pour les traitements NO, FO, NS et FS.

Par ailleurs, seul le traitement FS améliore la capacité de panification des variétés de plaine, en moyenne de 214% par rapport à NO. Pour les variétés d'altitude, les deux traitements de séchage solaire (NS et FS) améliorent la capacité de panification, respectivement 40 et 223% par rapport à NO.

En conclusion, les génotypes d'altitude semblent donc plus sensibles au séchage au soleil (NS et FS) que ceux de plaine. Ces derniers, montrent une sensibilité à l'irradiation solaire seulement après fermentation.

Les analyses Cluster (**Figure 60**) et test de Fisher (**Tableau 25**) ont été effectués sur les échantillons FS et confirment une grande variabilité dans la capacité de panification, avec deux groupes principaux :

i) Un groupe de 4 variétés (Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5 et Tambo 4) présentant des capacités de panification élevées, comprises entre 7,49 mL/g à 8,58 mL/g.

ii) Un groupe de 9 variétés constitué de deux sous-groupes :

Un sous-groupe de 4 variétés (CM4574-7, SM1498-4a, CM7138-7 et SM1058-13) avec des capacités de panification intermédiaires (5,29 mL/g à 6,59 mL/g).

Un sous-groupe de 5 variétés (HMC-1, CM6438-14, CM7436-7, CM7438-14 et SM7591-5) avec des capacités de panification faibles (3,05 mL/g à 4,47 mL/g).

Signalons que le génotype de plaine CM4574-7 présente une capacité de panification élevée. Il semblerait, ainsi, que les facteurs génétiques et environnementaux joueraient un rôle aussi important dans la capacité de panification que les différents traitements physicochimiques (fermentation et/ou séchage au soleil).

D'autres facteurs tels que l'introduction des lipides ou non dans la formulation peuvent contribuer à expliquer les différences observées entre échantillons.

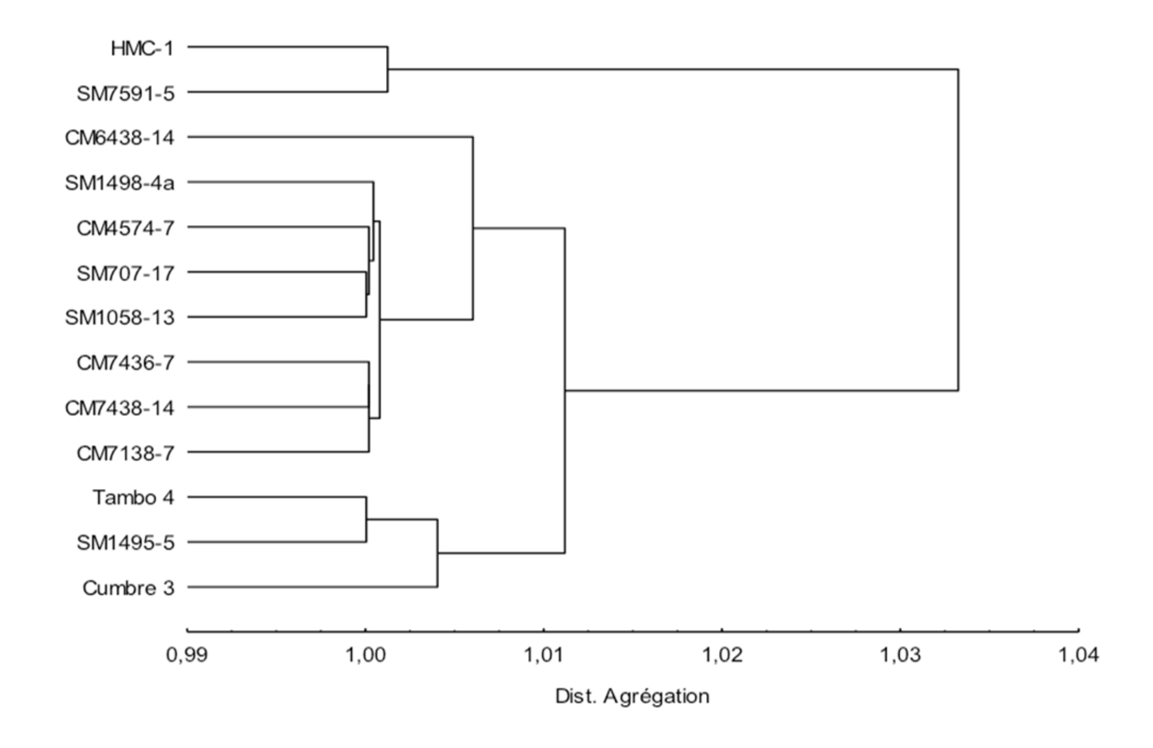


Figure 60. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation boulangère avec prégélatinisation et lipides des variétés soumises au traitement NO.

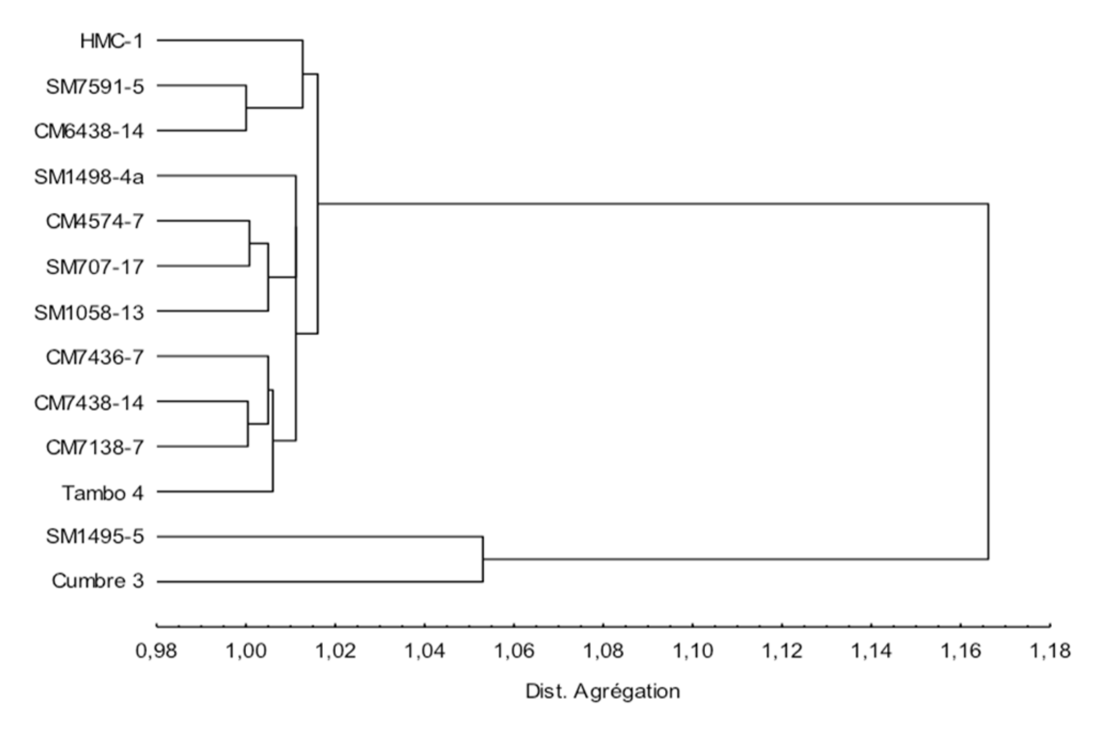


Figure 61. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation boulangère avec prégélatinisation et lipides des variétés soumises au traitement NS.

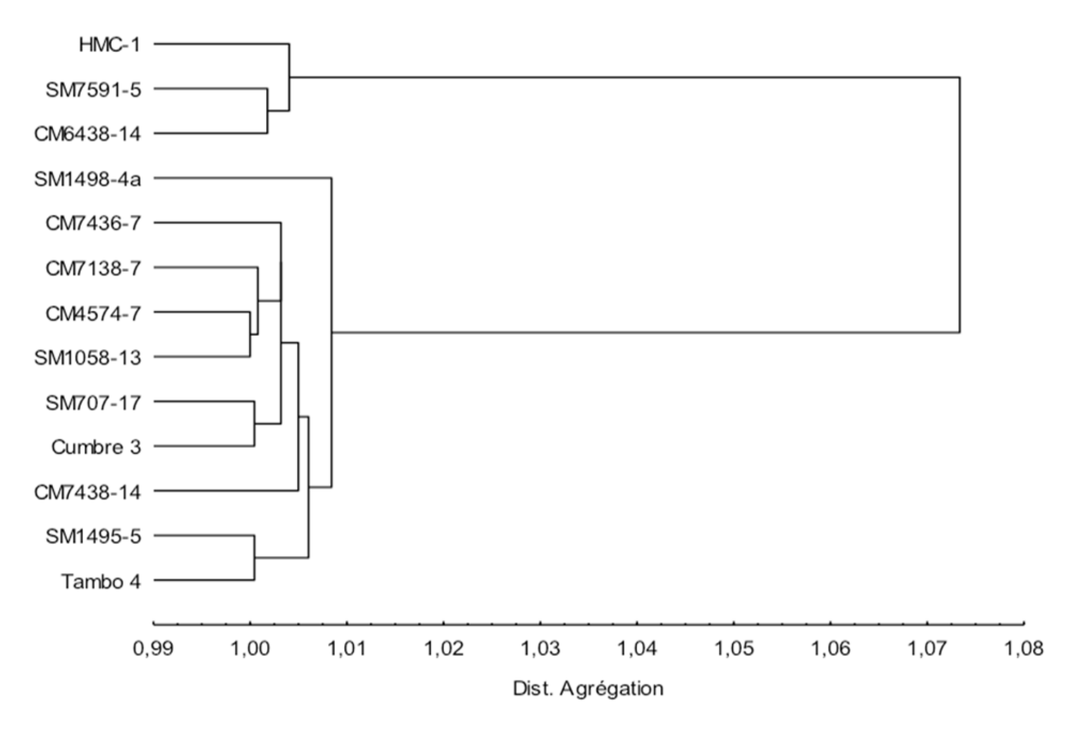


Figure 62. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation boulangère avec prégélatinisation et lipides des variétés soumises au traitement FO**.**

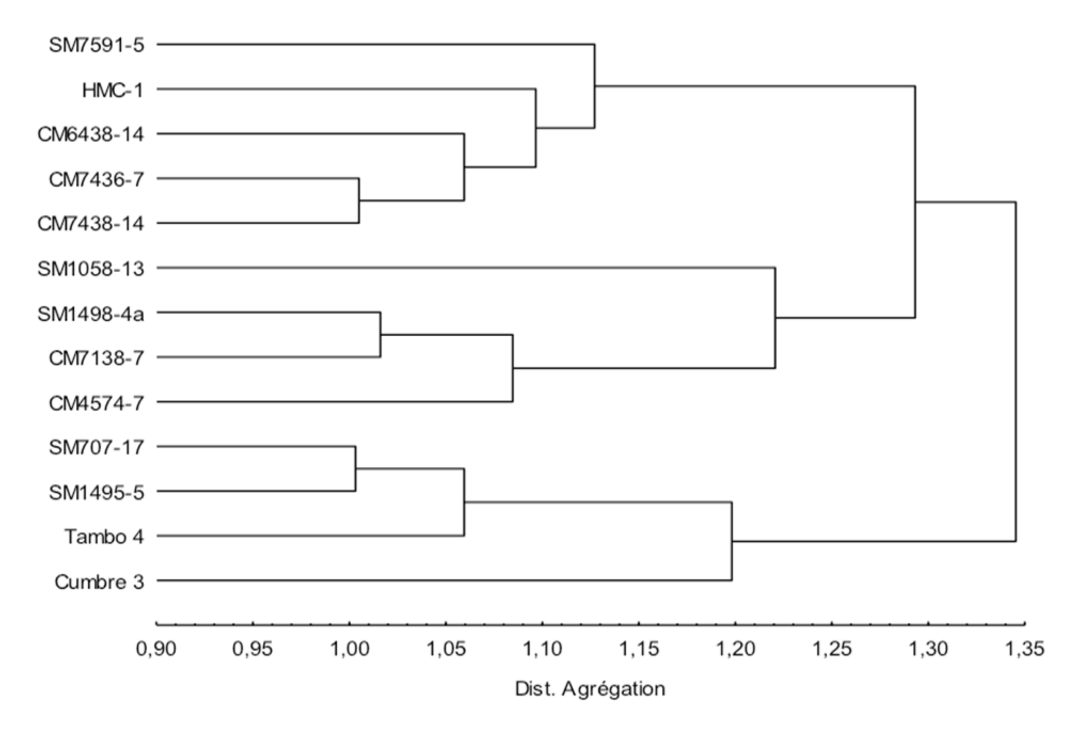


Figure 63. Analyse multivariée « Cluster » pour identifier des différences et des similitudes entre les capacités de panification ayant une formulation boulangère avec prégélatinisation et lipides des variétés soumises au traitement FS.

4.2.1.3. Comparaison entre la formulation avec prégélatinisation et lipides et la formulation avec HPMC (sans lipides).

La comparaison des deux formulations a été effectuée pour estimer l'influence des lipides sur la capacité de panification (Tester & Morrison, 1992).

Les capacités de panification moyennes des échantillons soumis aux traitements NO, FO, NS et FS et panifiés avec la formulation HPMC (sans lipides) sont respectivement 26,8 ; 58,0 ; 35,1 et 59,6% plus élevées qu'avec la formulation boulangère (avec lipides). Cette meilleure panification en absence de lipides, quel que soit le traitement, pourrait s'expliquer par la formation de complexes amylose-lipides, qui limiteraient le gonflement de la pâte du pain (Tester & Morrison, 1992). En conclusion, l'utilisation des lipides dans la recette de panification pourrait être un facteur déterminant de la capacité de panification.

4.2.2. Comportement d'empesage (RVA).

Objectif.

Déterminer l'évolution de la viscosité de l'amidon lors du chauffage et du refroidissement des différents échantillons en suspension aqueuse.

Analyse des résultats.

Les viscosités de 13 échantillons soumis à NO, NS, FO et FS ont été analysées.

Analyse du viscoamylogramme.

Les profils de viscosité des échantillons de plaine et d'altitude natifs (NO), non fermentés, séchés au soleil (NS) et fermentés, séchés au four (FO) présentent deux pics de viscosité, le premier (PV1) étant plus faible que le deuxième (PV2). Pour les échantillons fermentés, séchés au soleil (FS), un seul pic de viscosité a été observé. Ce pic unique des échantillons FS a été arbitrairement désigné comme correspondant à PV2, mais il peut être décrit comme étant le résultat de la fusion de deux pics (PV1 et PV2) observés dans les autres traitements. En effet, le peak time du pic de viscosité des échantillons FS est intermédiaire entre les peaks times de PV1 et PV2 des échantillons NO, NS et FO (**Figure 64**).

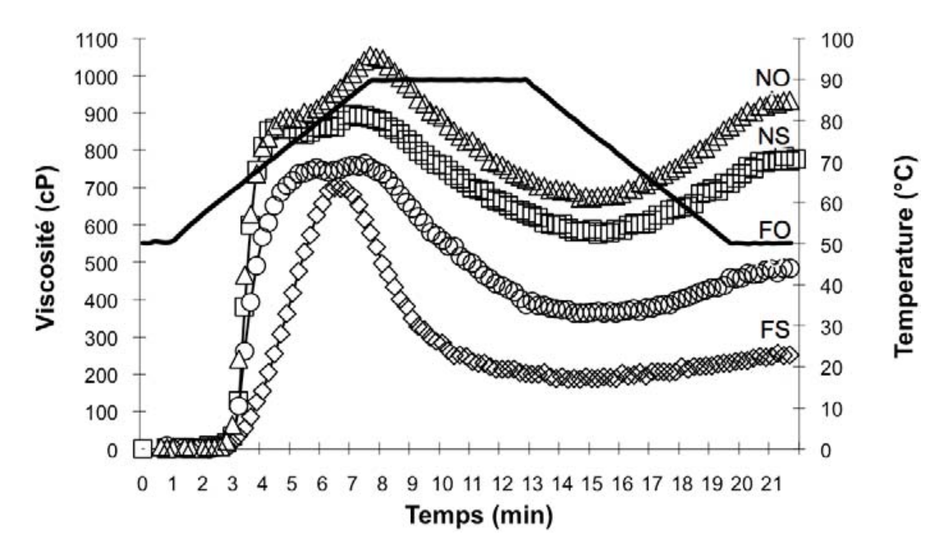


Figure 64. Viscoamylogramme d'un échantillon d'amidon du manioc (SM1495-5) soumis aux traitements : NO (△), NS (☐), FO (○) et FS (◊).

D'autres études de la viscosité RVA d'amidon de manioc fermenté n'ont observé qu'un seul pic de viscosité avant et après traitement (Franco *et al.*, 2010; Mestres, Zakhia, & Dufour, 1997). A notre connaissance, seuls Escobar *et al.* (2009) ont observé un seul pic pour des génotypes de plaine et deux pics pour des génotypes d'altitude.

Une analyse plus détaillée montre que dans le traitement NO, le second pic de viscosité est supérieur au premier (PV1 < PV2), à l'exception de 3 échantillons : CM7138-7, Cumbre 3 et Tambo 4, pour lesquels PV1 est soit supérieur, soit égal à PV2. Suite aux traitements, la différence entre les pics PV1 et PV2 diminue comme suit :

Pour le traitement NS, le pic PV1 demeure inferieur à PV2. Seulement pour deux échantillons (CM7436-7 et SM1495-5) l'ordre de grandeur change, avec le pic PV1 similaire à PV2.

Pour le traitement FO, les pics PV1 et PV2 ont été du même ordre de grandeur dans les cas de 5 génotypes (HMC-1, CM4574-7, CM7436-7, SM1495-5 et SM707-17). Deux

autres génotypes (CM7438-7 et Tambo 4) n'ont présenté qu'un seul pic PV2, PV1 ayant disparu.

Ces changements des pics de viscosité lors de la fermentation pourraient être expliqués par une diminution de la masse moléculaire et/ou une altération de la structure des granules. Cette hypothèse pourrait être confirmée par d'autres expérimentations.

Analyse des paramètres RVA.

Le **Tableau 26** résume les résultats des paramètres RVA de 3 échantillons de plaine et 10 d'altitude soumis aux différents traitements.

La pasting temperature (PT) de tous les génotypes et traitements a été mesurée entre 59,1 et 66,9°C. Ces résultats sont en accord avec des nombreux auteurs (Bertolini, 2000; Gomes *et al.*, 2005), notamment avec les travaux réalisés par Sánchez *et al.* (2009) sur environ 4000 génotypes de manioc (PT entre 58,8°C et 71,2°C).

Pour les échantillons natifs (NO), les paramètres PV2, BD, FV et SB ont été respectivement 950, 382, 835 et 263 cP. Excepté pour SB, ces résultats sont proches des travaux de Sánchez *et al.* (2009). Par conséquent, nous confirmons que ces résultats pour nos 13 génotypes correspondent à des valeurs typiques du manioc.

Les Pasting Temperature (PT) des échantillons de plaine et d'altitude présentent une différence statistique de 3,5°C (cf. **Tableau 26**). Ce paramètre est donc un bon indicateur pour identifier les espèces en fonction du lieu géographique, tout comme le paramètre de température de gélatinisation mesuré par DSC (cf. section sur les propriétés thermiques).

PV1 a été systématiquement plus élevé (81-168 cP plus élevé y compris dans le cas du pic unique des échantillons FS) pour les génotypes de plaine par rapport aux génotypes d'altitude.

Les paramètres breakdown (BD) et relative breakdown (RBD) sont plus élevés pour les échantillons traités par fermentation (FO et FS) que pour ceux qui n'ont pas été fermentés (NO et NS). Cette différence est plus marquée pour les espèces d'altitude.

Sachant que BD ainsi que RBD, sont reliés à la fragilité du granule d'amidon (Krishna Kumari & Thayumanavan, 1998), les analyses RVA pourraient indiquer que la structure granulaire des échantillons d'altitude est plus endommagée lors de la fermentation que celle des échantillons de plaine. Ceci s'expliquerait par un effondrement du granule entrainant ainsi une baisse plus importante de la viscosité corrélée au pic de viscosité PV2 (Bertolini *et al.*, 2000; Mestres *et al.*, 2000).

Tableau 26

Propriétés d'empesage des amidons de manioc natifs fermentés et/ou séchés au soleil.

Génotype/ Traitement [z]	Paramètres de viscosité								
	Pasting temperature (°C)	Peak viscosity 1 (cP)	Peak viscosity 2 (cP)	Breakdown (cP)	Relative Breakdown (%)	Final viscosity (cP)	Setback (cP)	Relative Setback (%)	Cooking ability (s)
Plaine									
NO [z]	65,1(0,2)[cd]	666(48)[a]	914(65)[de]	394(45)[bc]	43,1(2,7)[ab]	793(102)[c]	273(79)[c]	33,9(6,4)[b]	263(14)[cd]
NS [z]	65,0(0,7)[c]	687(38)[a]	913(37)[de]	345(38)[ab]	37,8(3,6)[a]	847(47)[c]	279(50)[c]	32,9(4,9)[b]	273(12)[cd]
FO [z]	65,6(0,4)[cd]	632(43)[a]	663(40)[ab]	310(39)[a]	46,8(4,9)[bc]	501(41)[b]	149(12)[b]	29,8(2,5)[b]	266(24)[cd]
FS [z]	66,2(0,7)[d]	-	637(36)[a]	403(21)[bc]	63,4(3,9)[d]	326(45)[a]	92(15)[ab]	28,3(2,4)[b]	173(16)[a]
Altitude									
NO [z]	61,6(1,1)[a]	835(62)[c]	960(117)[e]	378(42)[b]	39,7(6,0)[a]	844(166)[c]	260(67)[c]	30,8(4,0)[b]	286(29)[d]
NS [z]	61,6(1,2)[a]	834(45)[c]	889(87)[d]	361(68)[b]	40,9(9,0)[ab]	771(189)[c]	255(88)[c]	32,6(4,3)[b]	270(61)[cd]
FO [z]	62,0(0,9)[a]	777(46)[b]	808(38)[c]	425(49)[c]	52,6(5,7)[c]	522(64)[b]	139(23)[b]	26,7(3,2)[b]	256(46)[c]
FS [z]	62,8(1,1)[b]	-	718(41)[b]	504(50)[d]	70,4(7,8)[e]	286(98)[a]	52(71)[a]	13,9(20,7)[a]	208(16)[b]

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FO : fermenté, séché au four et FS : fermenté, séché au soleil.

[a-d] Les lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Le setback (SB) est un indice de la rétrogradation de l'amylose au cours du refroidissement (Betancur *et al.*, 2001). Ce phénomène de rétrogradation est relié à la réassociation des molécules d'amylose, par la formation de liaisons hydrogène entre groupements hydroxyles (Lawal, 2004; Thomas & Atwell, 1988). Des travaux ont montré que ces phénomènes sont corrélés positivement avec la teneur en amylose, la longueur de l'amylose et l'état de dispersion des chaînes d'amylose (Mishra & Rai, 2006; Thomas & Atwell, 1988).

Nos résultats montrent une diminution significative du setback après fermentation (FO et FS) de 46,3 et 76,6% (tous échantillons confondus), par rapport à NO, conformément à la littérature (Gomes *et al.*, 2005; Uzomah & Ibe, 2011). En revanche le relative setback (RSB) ne diminue respectivement que de 13,0% et 47,3% après FO et FS par rapport à NO, avec une plus forte diminution pour les génotypes d'altitude (55% pour FS par rapport à NO). Ces diminutions de SB et RSB s'expliquent d'une part par la baisse générale de viscosité tout au long du profil RVA après les traitements de fermentation, et d'autre part dans le cas des échantillons FS, par une moindre rétrogradation de l'amylose, peut-être due à son hydrolyse partielle, ce qui limiterait l'augmentation de la viscosité lors du refroidissement.

La viscosité finale (FV) est le paramètre le plus communément utilisé pour analyser un échantillon d'amidon et renseigne sur la capacité d'un matériel à gélifier après cuisson (Onitilo *et al.*, 2007; Osungbaro *et al.*, 2012). La FV a diminué de 37,8 et 64,5% après les traitements de fermentation FO et FS, par rapport à NO. La même tendance est suivie pour les génotypes de plaine et d'altitude, avec une diminution de ce paramètre après FO et FS de 36,8 et 58,9%, et de 38,1 et 66,1% respectivement, par rapport à NO. Il y n'a pas eu de différences significatives entre plaine et altitude, par conséquent le lieu de culture n'est pas un facteur déterminant pour la viscosité finale.

La capacité de cuisson (CA) a diminué après les traitements de fermentation FO et FS, respectivement de 8,2 et 28,9% par rapport à NO. Ceci traduit la fusion des deux pics de viscosité PV1 et PV2 après traitement de fermentation, qui réduit le temps pour atteindre le pic de viscosité PV2, et réduit donc d'autant la capacité de cuisson. Dans les génotypes de plaine, seul le traitement FS a réduit la capacité de cuisson par rapport à NO (34,4%) tandis que pour les génotypes d'altitude les traitements FO et FS l'ont diminué de 10,7 et 27,4% respectivement, par rapport à NO. Ceci indique que les génotypes d'altitude sont plus sensibles à la fermentation que les génotypes de plaine, en accord avec d'autres caractérisations (granulométrie, paramètre breakdown du RVA).

4.2.3. Liens entre propriétés physico-chimiques, structurelles et fonctionnelles

4.2.3.1. Effet de l'amylose sur la capacité de panification

Trois groupes d'échantillons à faible (15,7-16,7%), moyenne (17,6-20,1%) et haute (21,6-21,7%) teneurs en amylose ont été identifiés (**Figure 65**). Les quatre échantillons du groupe à faible teneur en amylose présentent également les quatre meilleurs pouvoirs de panification. Par conséquent, une faible teneur en amylose semble améliorer la capacité de panification, ce qui pourrait s'expliquer par la formation d'un nombre moins important de complexes amylose-lipides pendant la cuisson (Tester & Morrison, 1992).

Une faible corrélation négative de R^2 = 0,46 a été obtenue entre la capacité de panification des amidons fermentés, séchés au soleil (FS, tant pour les variétés de plaine que d'altitude) et la teneur en amylose (mesurée sur les amidons non fermentés, séchés au four, NO) (**Figure 65**). Quand une valeur aberrante a été retirée (la variété de plaine CM4574-7) la corrélation s'est vue améliorée avec un R^2 = 0,71 ; ce qui tend à confirmer le lien entre la teneur en amylose et la capacité de panification. Mestres *et al.* (2000) et Shirai *et al.* (2007) ont aussi reporté un lien entre la teneur en amylose et la capacité de panification, avec un faible gonflement pour de l'amidon de maïs normal oxydé et un gonflement élevé pour de l'amidon de maïs cireux (waxy) oxydé, comparables à de l'amidon aigre de manioc ou à de l'amidon de manioc oxydé.

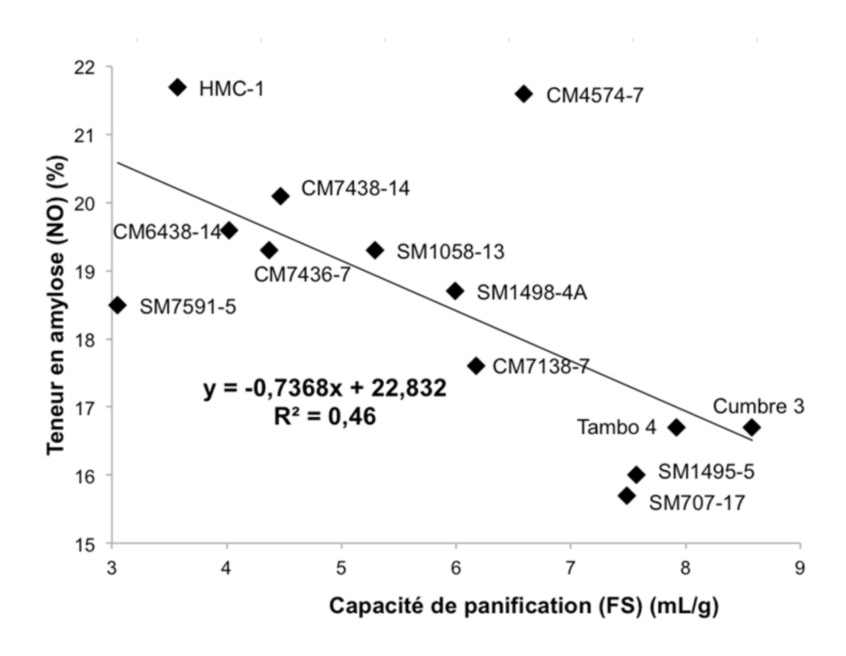


Figure 65. Corrélation négative (R^2 = 0,46) entre la capacité de panification des amidons fermentés, séchés au soleil (FS) et la teneur en amylose des amidons non fermentés, séchés au four (NO) d'altitude.

4.2.3.2. Effet de la structure granulaire sur la capacité de panification

Les résultats de granulométrie, viscosité intrinsèque et viscosité pendant l'empesage (RVA) indiquent que la structure des granules d'amidon est modifiée au cours du traitement de fermentation, et que les génotypes de plaine et d'altitude ne montrent pas la même sensibilité à ces traitements.

Pour les génotypes de plaine, seules les couches externes des granules seraient hydrolysées et supprimées au cours de la fermentation, alors que le noyau des granules resterait pratiquement inchangé avec des molécules d'amidon quasi-intactes. Cette hypothèse est soutenue par les observations suivantes :

(1) Le diamètre des granules de plaine diminue après la fermentation, ce qui indique une hydrolyse de leurs couches externes.

(2) La viscosité intrinsèque diminue peu suite aux traitements NS et FO (respectivement 5,9% et 4,5% par rapport à NO), ce qui signifie que les molécules d'amidon dans les noyaux des granules n'ont pas été hydrolysées.

(3) La viscosité de pic (PV2) et le breakdown (BD) sont faibles comparés aux génotypes d'altitude, ce qui indique une meilleure résistance de la structure du granule au gonflement et au cisaillement, et donc des noyaux intacts ou peu endommagés, après l'hydrolyse des couches externes.

Pour les génotypes d'altitude, la fermentation attaquerait de façon homogène les couches externes et la structure interne des granules, ce qui entraînerait l'affaiblissement des granules, mais pas une réduction significative de leur diamètre. Cette hypothèse est soutenue par les observations suivantes :

(1) Le diamètre des granules d'altitude ne diminue pas après la fermentation, ce qui indique soit une absence d'hydrolyse des molécules d'amidon, soit une hydrolyse distribuée sur l'ensemble de la structure des granules.

(2) La viscosité intrinsèque diminue fortement dès les traitements NS et FO (respectivement 23,8% et 26,4% par rapport à NO), ce qui signifie que l'hydrolyse des molécules d'amidon contenues dans les granules a bien eu lieu.

(3) La viscosité de pic (PV2) et le breakdown (BD) sont élevés comparés aux génotypes de plaine, ce qui indique une plus faible résistance de la structure du granule au gonflement et au cisaillement, et donc une structure interne des granules endommagée gonflant puis s'effondrant plus facilement au cours de l'empesage.

La meilleure panification constatée pour les génotypes d'altitude pourrait ainsi s'expliquer par la dégradation et l'affaiblissement de l'ensemble de la structure des granules, permettant l'ouverture plus complète et/ou rapide des granules au cours de la cuisson.

4.2.3.3. Analyse en composantes principales

Dans le but de confirmer nos résultats, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée, en utilisant cinq paramètres sélectionnés de RVA (PT, PV2, CA, BD et FV), la taille des granules d'amidon et les valeurs de capacité de panification pour les 13 échantillons (**Figure 66a et 66b**).

L'analyse ACP donne un aperçu des similitudes et des différences entre les amidons et des relations entre les propriétés physico-chimiques (**Figure 66a et 66b**). Les première et deuxième composantes principales (PC1 et PC2) expliquent respectivement 53% et 19% de la variation totale.

La représentation de l'espace des individus (**Figure 66a**) confirme l'effet plus marqué de la fermentation par rapport au séchage au soleil, étant donné que les échantillons NO et NS apparaissent mélangés dans un même groupe, alors que les échantillons FO et FS sont séparés le long de la première composante principale (PC1). Néanmoins, la synergie entre la fermentation et le séchage au soleil a également été confirmé, avec des échantillons FS nettement séparés, tandis que les échantillons FO se trouvent à proximité du groupe d'échantillons NO + NS. D'autre part, un effet différentiel de la fermentation a été observé selon l'altitude de la culture, avec une séparation des échantillons fermentés de plaine et d'altitude (FO et FS) le long du PC2.

La représentation de l'espace des variables (**Figure 66b**) confirme les observations précédentes, en particulier la plus petite taille des granules d'amidon des génotypes de plaine fermentés, la température d'empesage plus élevée (PT) des génotypes de plaine, la diminution de la viscosité RVA (PV2, FV) au cours des traitements de NO à FS, la breakdown élevée et la meilleure capacité de panification (BM) des échantillons d'altitude FS. Cette dernière observation a confirmé l'utilisation potentielle de la breakdown RVA en tant que paramètre prédictif de la capacité de panification de l'amidon aigre.

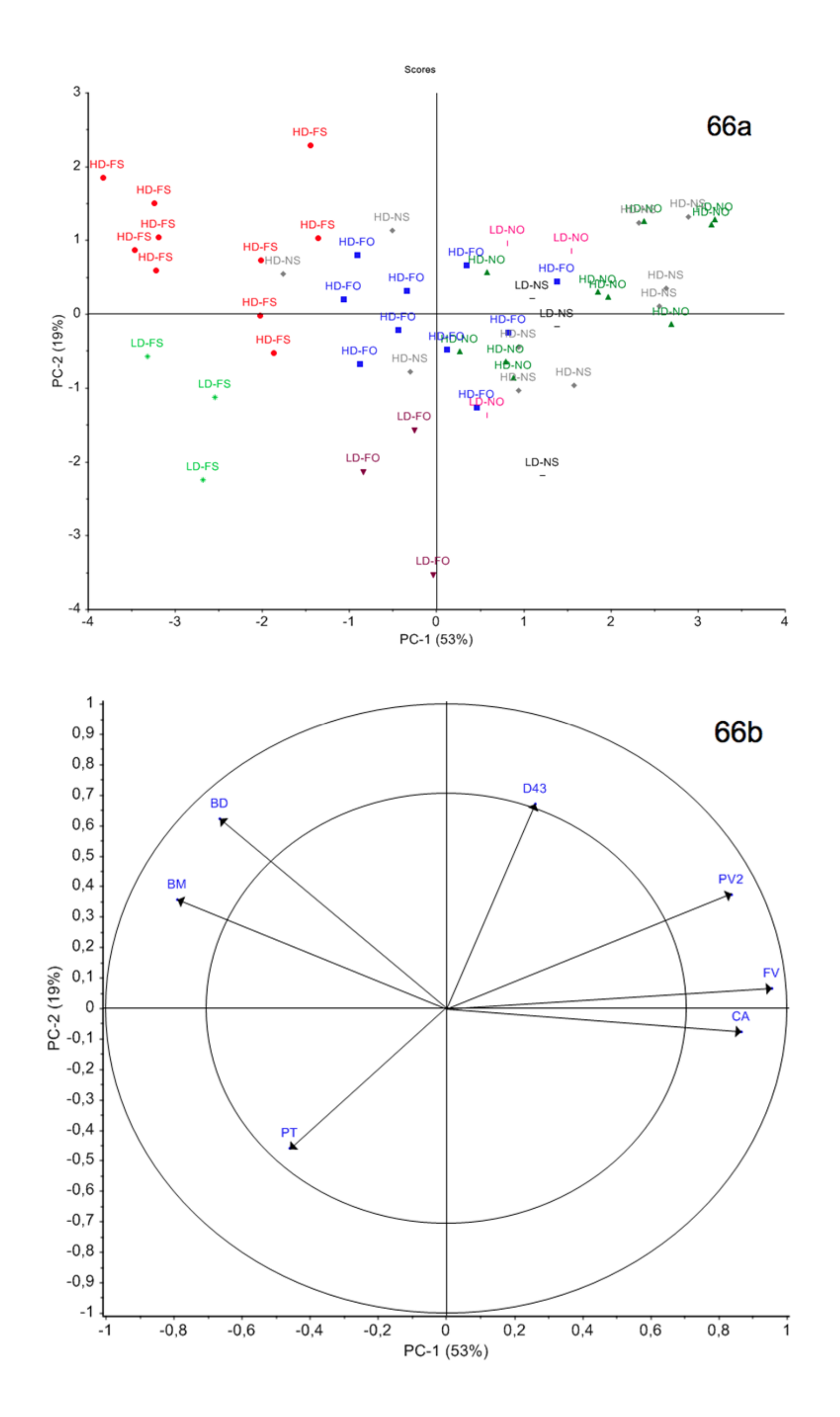


Figure 66. Espace des individus (**66a**) et espace des variables (**66b**) des principales composantes 1 et 2 décrivant la diversité des échantillons. HD = génotypes d'altitude et LD = génotypes de plaine. NO : non fermenté, séché au four ; FO : fermenté, séché au four; NS : non fermenté, séché au soleil; FS : fermenté, séché au soleil. BM = capacité de panification, BD = Breakdown RVA, D43 = diamètre moyen du granule, PV2 = Peak viscosity 2, FV = Final viscosity, CA = Cooking ability, PT = Pasting temperature. Les différentes couleurs correspondent aux échantillons regroupés par lieux géographiques et traitements post-récolte.

4.2.4. Conclusion partielle : Caractérisation fonctionnelle des amidons de manioc natifs et fermentés/séchés au soleil

Des variations importantes entre génotypes et traitements ont été mises en évidence pour la capacité de panification et pour la viscosité pendant l'empesage (RVA).

En comparant les propriétés fonctionnelles et les propriétés physico-chimiques et structurelles des amidons, deux facteurs déterminants de la capacité de panification ont été identifiés : D'une part une teneur en amylose faible est liée à une meilleure panification, d'autre part l'hydrolyse des molécules d'amidon pendant la fermentation doit avoir lieu dans l'ensemble de la structure des granules plutôt que seulement en surface, de façon à faciliter l'ouverture des granules, et donc la formation des parois autour des bulles en expansion au cours de la cuisson.

Afin de confirmer l'hypothèse d'une différence de sensibilité des génotypes de plaine et d'altitude à l'hydrolyse au cours de la fermentation, des mesures complémentaires de porosité et d'hydrolyse enzymatique des granules ont été effectuées (section suivante).

4.3. Caractérisations complémentaires pour vérifier les différences de structure des granules après traitements de fermentation et séchage au soleil

4.3.1. Porosité des granules

Objectifs.

Tester l'hypothèse selon laquelle le traitement de fermentation endommage toute la structure des granules d'amidon des génotypes d'altitude (couches externes et noyau), et seulement les couches externes des granules des génotypes de plaine : Démontrer que la porosité fermée (porosité à l'hélium) et/ou ouverte (porosité au mercure), des granules d'amidon des génotypes d'altitude augmente lors de la fermentation, et que celle des granules d'amidon des génotypes de plaine ne varie pas significativement.

4.3.1.1. Porosité à l'hélium.

Tableau 27

Densité des amidons de manioc natifs et fermentés.

Génotype	Densité ($g.mL^{-3}$)	
	Traitement [z]	
	NO [z]	FO [z]
Plaine		
HMC-1	1,58 (0,00) [a]	1,58 ($7,00.10^{-4}$) [a]
CM6438-14	1,51 ($7,00.10^{-4}$) [a]	1,58 ($7,00.10^{-4}$) [b]
CM4574-7	1,60 ($3,50.10^{-3}$) [a]	1,59 ($1,40.10^{-3}$) [a]
Altitude		
CM7436-7	1,61 ($2,80.10^{-3}$) [b]	1,58 ($4,90.10^{-3}$) [a]
CM7438-14	1,59 ($1,40.10^{-3}$) [b]	1,57 ($1,40.10^{-3}$) [a]
SM1498-4a	1,58 ($7,00.10^{-4}$) [a]	1,58 ($7,00.10^{-4}$) [a]
CM7138-7	1,58 ($2,80.10^{-3}$) [a]	1,58 ($4,20.10^{-3}$) [a]
SM7591-5	1,59 ($1,40.10^{-3}$) [a]	1,57 (0,00) [a]
Cumbre 3	1,60 ($1,00.10^{-2}$) [a]	1,61 ($1,70.10^{-2}$) [a]
SM707-17	1,59 ($7,00.10^{-4}$) [a]	1,58 ($7,00.10^{-4}$) [a]
SM1495-5	1,58 ($1,40.10^{-3}$) [a]	1,59 ($4,90.10^{-3}$) [a]
Tambo 4	1,57 ($7,00.10^{-4}$) [a]	1,56 (0,00) [a]
Plaine	1,56 ($3,95.10^{-2}$) [a]	1,58 ($7,50.10^{-3}$) [b]
Altitude	1,59 ($1,24.10^{-2}$) [a]	1,58 ($1,76.10^{-2}$) [a]
Tous	1,58 ($2,33.10^{-2}$) [a]	1,58 ($1,56.10^{-2}$) [a]

[z] Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FO : fermenté, séché au four.

[a-b] Des lettres différentes, dans chaque rangée, indiquent les différences significatives en $p < 0,05$ (Tukey).

Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Le **Tableau 27** montre les densités particulaires mesurées avec un pycnomètre à hélium pour les 13 génotypes d'amidon de manioc soumis à 2 traitements : natif (NO) et fermenté (FO). Ces valeurs sont dans la gamme 1,51-1,61 $g.mL^{-3}$ et 1,56-1,61 $g.mL^{-3}$, respectivement, en accord à Juszczak, Fortuna, & Wodnicka (2002), qui ont estimé la densité d'amidons natifs de manioc entre 1,49 $g.mL^{-3}$ et 1,52 $g.mL^{-3}$.

Aucune différence significative de densité particulaire moyenne n'a été identifiée entre les génotypes soumis aux traitements NO et FO. Par conséquent, les analyses de densité particulaire réalisées au pycnomètre à hélium ne permettent pas de confirmer l'hypothèse d'une sensibilité à la fermentation différente entre génotypes de plaine et d'altitude.

Cette observation permet de conclure que la fermentation n'a pas créé de porosité occluse (mesurable par cette technique). Par contre, cette technique ne permet pas de mesurer d'éventuelles dégradations de surface qui auraient pu être provoquées par la fermentation et auraient conduit à la création de pores ouverts.

Afin de déterminer la distribution de diamètre des pores ouverts, des mesures de porosité à l'aide d'un porosimètre au mercure ont été envisagées. Cette méthode pourrait mettre en évidence des différences entre les échantillons fermentés et non-fermentés.

4.3.1.2. Porosité au mercure.

L'analyse de porosité au mercure mesure la distribution de taille des pores ouverts (accessibles au mercure). Un génotype d'altitude présentant une bonne panification (Cumbre 3) a été sélectionné pour réaliser une mesure préliminaire, selon l'hypothèse que ce génotype devrait présenter une différence de porosité importante entre le traitement natif (NO) et le traitement fermenté (FO). Cependant, les résultats n'ont pas permis de confirmer que la fermentation augmente la taille des pores des granules d'amidon pour cet échantillon.

La somme du volume de pores de taille inférieure à 1 µm pour l'échantillon natif est de 0,037 $mL.g^{-1}$ tandis que pour l'échantillon fermenté elle est de 0,036 $mL.g^{-1}$ Cette limite de taille de pores (1 µm) a été retenue car elle est compatible avec une porosité intragranulaire des amidons. Ces différences ne peuvent être considérées comme significatives, étant de plus en présence d'un matériau organique. La **Figure 67** présente les courbes de la porosité totale du lit de poudre. On observe de très nombreux pores compris entre 1 et 100 micromètres, il s'agit de la porosité interparticulaire qui ne nous intéresse pas dans ce travail. La **Figure 68** présente de façon plus précise la porosité inférieure à 1 µm (intraparticulaire) qui, elle, peut être attribuée au granule d'amidon.

En conclusion, les analyses par pycnométrie à l'hélium et porosité au mercure n'ont mis en évidence aucune différence significative entre la porosité du granule d'amidon avant et après fermentation. Ces deux méthodes ne sont peut-être pas suffisamment sensibles

pour détecter les différences recherchées, étant donné que le taux de dégradation provoqué par la fermentation est faible, estimé autour de 1% (Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998).

Pour poursuivre ces investigations, la méthode de mesure de la porosité par adsorption de gaz BET (méthode Brunauer, Emett et Teller) qui détermine la surface spécifique pourrait être intéressante à utiliser pour comparer les granules d'amidon suite aux traitements de fermentation et séchage solaire. Cependant, les faibles différences notées avec les deux analyses que nous venons de présenter laissent présager des résultats peu significatifs également avec cette méthode.

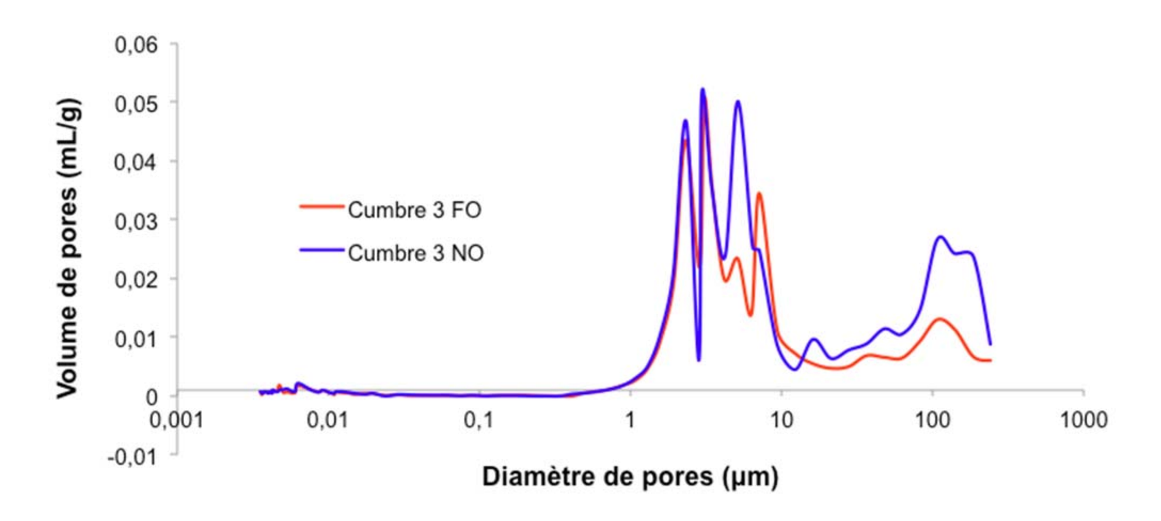


Figure 67. **Volume de pores en fonction de leurs diamètres (0,001 à 1000 µm) du génotype Cumbre 3 soumis à deux traitements (NO et FO).**

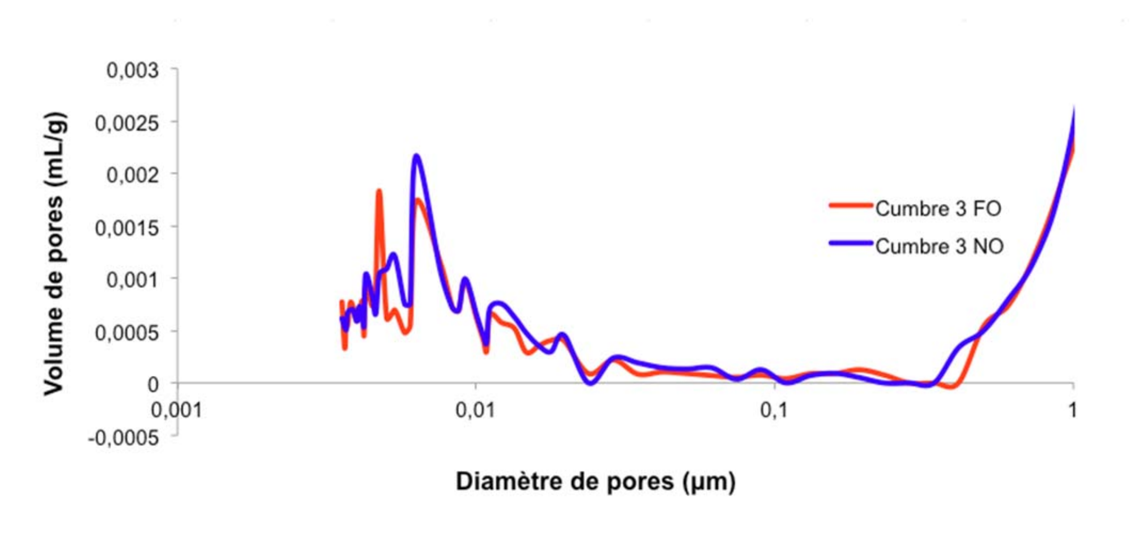


Figure 68. Volume de pores en fonction de leurs diamètres (0,001 à 1 µm) du génotype Cumbre 3 soumis à deux traitements (NO et FO).

4.3.2. Digestibilité enzymatique.

Objectifs.

Confirmer l'effet des traitements, du lieu géographique et/ou du génotype pour la sensibilité du granule par rapport à l'attaque de l'α-amylase.

Tester l'hypothèse selon laquelle le traitement de fermentation endommage toute la structure des granules d'amidon des génotypes d'altitude (couches externes et noyau), et seulement les couches externes des granules des génotypes de plaine : Démontrer que les granules des génotypes d'altitude, endommagés dans toute leur structure, sont plus sensibles à l'hydrolyse enzymatique que les génotypes de plaine.

Analyse des résultats.

Les résultats de digestibilité enzymatique sont indiqués dans la **Figure 69** et le **Tableau 28**. Le pourcentage moyen massique d'hydrolyse (i.e. par 100 g de substrat amylacé) à 24 heures a été retenu comme critère pour évaluer les effets de l'hydrolyse sur les différents échantillons. 7 génotypes (2 de plaine et 5 d'altitude) soumis à 3 traitements (NO, FO et FS) ont été étudiés.

Hydrolyse de l'amidon de pomme de terre.

Nous avons utilisé l'hydrolyse de l'amidon de pomme de terre comme valeur référence (témoin). Une moyenne de 22,2% a été obtenue. Cette valeur est plus élevée que celle obtenue par d'autres équipes sur le même type d'amidon. En effet, Valetudie *et al.* (1993) ; Planchot, Colonna, Gallant, & Bouchet (1995) et Varatharajan *et al.* (2011) indiquent respectivement des pourcentages d'hydrolyse de 14, 9 et 7%. Ces différences pourraient être interprétées par l'utilisation de différents échantillons d'amidon et/ou protocoles.

Signalons qu'au bout de 72 heures d'hydrolyse, le pourcentage d'hydrolyse du témoin est de 50,6% et n'atteint pas un plateau asymptotique sur la courbe (% d'hydrolyse en fonction du temps). Les études de Varatharajan *et al.* (2011) ont montré un pourcentage d'hydrolyse de 15% pour l'amidon de pomme de terre natif et ceci également sans arriver à un plateau.

D'après Uthumporn, Shariffa, & Karim (2012), l'amidon de pomme de terre présente une résistance élevée à l'amylolyse due à sa teneur élevée en doubles-hélices d'amylose et à la longueur de chaînes de l'amylopectine.

L'amidon de pomme de terre a été choisi comme référence car il est l'amidon le plus utilisé dans les analyses d'hydrolyse enzymatique. Le temps important consacré à la mise au point de ce protocole de digestibilité enzymatique et à l'analyse de nos variétés d'amidon nous ont empêché de travailler avec plus d'échantillons de référence de différentes origines botaniques pour avoir une gamme de valeurs de référence.

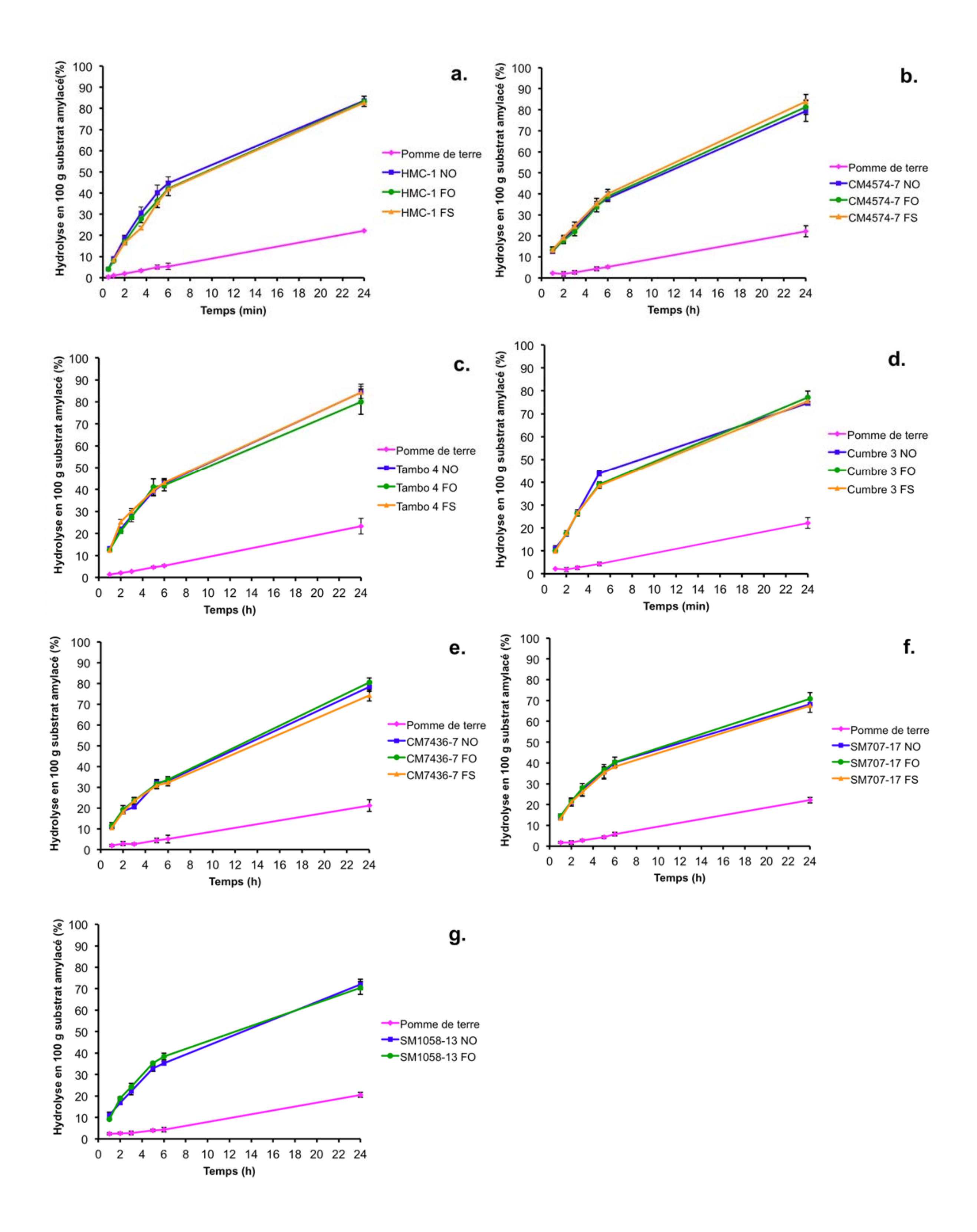


Figure 69. Cinétiques d'hydrolyse à 37°C par l'α-amylase-pancréatique de 7 génotypes d'amidon de manioc : (a) HMC-1, (b) CM4574-7, (c) Tambo 4, (d) Cumbre 3, (e) CM7436-7, (f) SM707-17 et (g) SM1058-13 soumis à 3 traitements NO (non fermenté, séché au four) (en bleu), FO (fermenté, séché au four) (en vert) et FS (fermenté, séché au soleil) (en orange). L'amidon de pomme de terre correspond au témoin (en magenta).

Tableau 28

Niveaux de dégradation des amidons de manioc natifs, fermentés et/ou séchés au soleil après 1, 2, 3, 5, 6 et 24 heures d'amylolyse.

Génotype	Trait. ^{z}	Hydrolyse par α-amylase-pancréatique pour 100 g de substrat amylacé (%) ^{y}					
		1 h	2 h	3 h	5 h	6 h	24 h
Plaine							
HMC-1	NO	9,08(0,71)^{ab}	18,74(1,42)^{bc}	26,64(1,84)^{de}	40,25(3,47)^{ij}	44,58(3,11)^{e}	83,59(0,56)^{h}
	FO	8,04(0,68)^{a}	16,80(1,27)^{ab}	24,20(1,26)^{bcd}	36,23(3,08)^{defgh}	42,17(3,41)^{de}	83,34(2,39)^{h}
	FS	8,35(0,27)^{a}	16,48(0,45)^{a}	23,54(0,77)^{bc}	35,46(0,76)^{cdef}	41,88(0,69)^{de}	82,69(0,80)^{gh}
CM4574-7	NO	12,59(0,34)^{fg}	18,10(1,77)^{abc}	23,35(1,62)^{b}	34,38(0,81)^{bcde}	37,85(1,49)^{bc}	79,40(4,95)^{efgh}
	FO	13,14(1,46)^{gh}	17,74(1,01)^{abc}	22,06(2,02)^{ab}	33,84(2,43)^{abcde}	38,74(2,11)^{c}	81,18(3,40)^{fgh}
	FS	13,33(0,71)^{ghi}	19,23(1,49)^{cdef}	24,58(0,86)^{bcd}	35,40(1,85)^{cdef}	40,04(1,63)^{cd}	83,86(1,07)^{h}
Altitude							
Tambo 4	NO	13,12(0,46)^{gh}	21,91(1,03)^{g}	27,87(2,59)^{ef}	39,21(2,24)^{ghi}	42,87(2,17)^{de}	84,27(2,74)^{h}
	FO	12,51(0,72)^{fg}	21,00(0,94)^{efg}	27,43(1,04)^{e}	41,16(3,67)^{ij}	41,93(2,55)^{de}	80,03(5,75)^{efgh}
	FS	12,28(0,50)^{efg}	25,36(1,09)^{h}	30,14(1,22)^{f}	39,60(0,30)^{hi}	43,16(1,09)^{de}	84,22(3,86)^{h}
Cumbre 3	NO	10,98(1,38)^{cde}	17,30(0,84)^{abc}	26,56(0,47)^{de}	43,89(1,12)^{j}	-	74,59(0,87)^{bcd}
	FO	10,12(0,18)^{bc}	17,65(0,48)^{abc}	26,33(0,84)^{de}	38,99(1,17)^{fghi}	-	77,09(2,79)^{cdef}
	FS	9,86(0,72)^{bc}	17,68(1,19)^{abc}	26,56(1,42)^{de}	38,56(1,40)^{fghi}	-	75,41(1,80)^{bcde}
CM7436-7	NO	11,15(0,61)^{cde}	18,51(0,98)^{abc}	20,46(0,62)^{a}	32,14(1,60)^{abc}	33,14(1,35)^{a}	78,29(2,16)^{defg}
	FO	11,58(1,36)^{def}	19,18(2,01)^{cde}	23,48(1,55)^{bc}	31,47(2,01)^{ab}	33,67(1,44)^{a}	80,43(2,22)^{efgh}
	FS	10,56(0,46)^{cd}	18,18(0,89)^{cde}	23,44(1,63)^{bc}	30,76(1,48)^{a}	32,35(1,68)^{a}	74,18(2,68)^{bcd}
SM707-17	NO	14,44(0,98)^{hi}	20,87(1,53)^{defg}	27,20(2,94)^{e}	35,71(3,48)^{defg}	40,16(1,08)^{cd}	68,15(0,11)^{a}
	FO	14,53(0,94)^{i}	21,43(1,47)^{g}	27,97(0,64)^{ef}	36,69(0,94)^{efgh}	40,36(2,43)^{cd}	70,81(3,08)^{ab}
	FS	13,39(0,70)^{ghi}	21,24(2,01)^{fg}	26,02(2,16)^{cde}	35,46(2,75)^{cdef}	38,25(0,32)^{bc}	67,42(3,17)^{a}
SM1058-13	NO	11,09(1,31)^{cde}	16,85(0,77)^{ab}	22,29(1,75)^{ab}	32,89(1,37)^{abcd}	35,22(0,90)^{ab}	72,01(2,46)^{abc}
	FO	9,12(0,38)^{ab}	18,92(0,60)^{cd}	24,37(1,55)^{bcd}	35,19(0,65)^{cdef}	38,35(1,57)^{bc}	70,40(3,05)^{ab}
Plaine	NO	10,84(1,99)^{a}	18,42(1,48)^{a}	24,99(2,38)^{a}	37,31(3,93)^{a}	41,21(4,28)^{a}	81,50(3,90)^{b}
	FO	10,59(2,97)^{a}	17,27(1,15)^{a}	23,13(1,91)^{a}	35,04(2,80)^{a}	40,45(3,16)^{a}	82,26(2,88)^{b}
	FS	10,84(2,77)^{a}	17,86(1,80)^{a}	24,06(0,93)^{a}	35,43(1,26)^{a}	40,96(1,51)^{a}	83,28(1,06)^{b}
Altitude	NO	12,24(1,66)^{a}	19,09(2,24)^{a}	24,88(3,47)^{a}	36,26(4,58)^{a}	37,84(4,22)^{a}	75,35(5,43)^{a}
	FO	11,57(2,07)^{a}	19,64(1,79)^{a}	25,92(2,05)^{a}	36,54(3,90)^{a}	38,58(3,69)^{a}	75,65(5,58)^{a}
	FS	11,52(1,54)^{a}	20,61(3,40)^{a}	26,54(2,97)^{a}	35,87(3,96)^{a}	37,92(4,80)^{a}	74,41(6,62)^{a}
Tous	NO	11,82(1,83)^{a}	18,90(2,04)^{a}	24,91(3,14)^{a}	36,58(4,32)^{a}	38,97(4,43)^{a}	77,29(5,70)^{a}
	FO	11,29(2,33)^{a}	18,96(1,94)^{a}	25,12(2,35)^{a}	36,09(3,60)^{a}	39,20(3,54)^{a}	77,64(5,76)^{a}
	FS	11,29(1,98)^{a}	19,69(3,20)^{a}	25,66(2,70)^{a}	35,71(3,21)^{a}	39,13(4,04)^{a}	77,73(6,81)^{a}

^{y} Valeurs obtenues à partir des analyses de digestibilité enzymatique.

^{z} Traitements : NO : non fermenté, séché au four; FO : fermenté, séché au four et FS : fermenté, séché au soleil.

$^{a\text{-}j}$ Les lettres en exposant, dans chaque colonne, indiquent les différences statistiquement significatives en $p < 0,05$ (Fisher).

Les écarts-types sont indiqués entre parenthèses.

Hydrolyse des amidons de manioc.

Au bout de 24 heures d'hydrolyse, le pourcentage moyen d'hydrolyse observé pour les échantillons natifs (NO) est de 77,3%. Les travaux de Valetudie *et al.* (1993) et Blazek & Gilbert (2010), utilisant également une α-amylase pancréatique, ont montré des valeurs plus faibles d'hydrolyse, respectivement 46% et 43%. Ces différences pourraient être dues à l'utilisation de génotypes ou de protocoles différents (e.g. concentration d'enzyme différente).

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les pourcentages d'hydrolyse des échantillons soumis aux traitements NO, FO et FS, après 24 heures d'hydrolyse. Par conséquent, la digestibilité enzymatique ne permet pas démontrer que le granule d'amidon est plus sensible à l'attaque par α-amylase après fermentation et/ou séchage au soleil. Ces résultats sont en accord avec la littérature : Camargo *et al.* (1988), qui ont testé l'hydrolyse enzymatique jusqu'à 150 min, ont obtenu des résultats similaires avec des amidons de manioc soumis aux traitements NO et FO. Les pourcentages d'hydrolyse reportés par Camargo *et al.* (1988) sont cependant plus faibles que dans notre étude : 7 et 11% après respectivement 1 et 2 heures d'incubation, contre respectivement 11 et 19% pour notre étude.

En revanche, les pourcentages d'hydrolyse après 24 heures des échantillons de plaine soumis aux différents traitements sont significativement plus élevés que ceux des échantillons d'altitude (**Tableau 28**), avec des différences de 6,2 ; 6,6 et 8,9% respectivement pour les traitements NO, FO et FS. Ces différences contredisent notre hypothèse, et pourraient être expliquées par la teneur en amylose plus élevée pour les génotypes de plaine, ou par des variations de la structure cristalline et/ou amorphe des différents génotypes.

4.3.3. Conclusion partielle : Vérification des différences de structure des granules après traitements de fermentation et séchage au soleil

Les mesures de porosité et de digestibilité enzymatique n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle le traitement de fermentation endommage toute la structure des granules d'amidon des génotypes d'altitude (couches externes et noyau), et seulement les couches externes des granules des génotypes de plaine. Cette hypothèse, introduite pour interpréter les résultats de granulométrie, viscosité intrinsèque et RVA, se trouve donc soit réfutée, soit non-confirmée par les données structurales disponibles, dans le cas où les changements sont trop faibles pour être détectés avec les méthodes utilisées.

Néanmoins la capacité de panification de l'amidon aigre semble déterminée à la fois à l'échelle moléculaire et à l'échelle supra-moléculaire (structure du granule d'amidon). Pour de futures études, les phénomènes intervenant à ces deux échelles doivent donc être pris en compte pour arriver à une description complète de la panification de l'amidon aigre.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives.

En Amérique du Sud, une alternative traditionnelle à la farine de blé est l'amidon de manioc aigre lequel offre une excellente capacité de panification (Cereda (1973) et Westby & Cereda (1994) au Brésil et Cárdenas & De Buckle (1980) et Zakhia, Dufour, Chuzel, & Griffon (1996) en Colombie). Ce produit est utilisé localement pour la fabrication de produits de boulangerie et pâtisserie. Par ailleurs, ce type d'amidon modifié par fermentation et irradiation UV peut être utilisé comme adjuvant dans la production de pain ou comme le principal ingrédient dans la fabrication de produits sans gluten. Cependant, le processus d'obtention de l'amidon aigre étant empirique, la capacité de panification des produits finis est d'une qualité irrégulière et souvent imprévisible. Plusieurs auteurs ont étudié la capacité de panification de l'amidon aigre, notamment l'influence des traitements post-récolte : fermentation et séchage solaire. L'effet synergique de ces deux traitements entraîne une dégradation de l'amidon responsable d'une meilleure panification. Ces altérations peuvent se situer au niveau moléculaire (formation de radicaux libres, oxydation et dépolymérisation) ou au niveau supramoléculaire (comportement du granule d'amidon lors de la gélatinisation). Néanmoins, la nature de ces changements n'a pas encore été complètement élucidée.

Par ailleurs, peu d'études ont évalué l'influence du génotype du manioc sur la capacité de panification. Une seule étude a mis en évidence l'influence positive de la culture du manioc en altitude sur la capacité de panification.

S'appuyant sur ce constat, l'objectif de notre travail a été de contribuer à une meilleure compréhension des propriétés de l'amidon aigre de manioc et notamment de déterminer l'importance de l'effet du génotype, de l'altitude de culture et des procédés post-récolte (fermentation et/ou séchage solaire) sur la capacité de panification. Trois approches ont été combinées afin d'identifier des facteurs déterminants du pouvoir de panification :

- Caractérisation physico-chimique et structurelle des amidons de manioc.
- Caractérisation fonctionnelle des amidons de manioc.
- Caractérisations complémentaires afin de tester les hypothèses formulées à partir des caractérisations physico-chimiques, structurelles, et fonctionnelles.

Ainsi, nous développerons par la suite les conclusions de ces approches :

1. Facteurs déterminants de la capacité de panification de l'amidon aigre

1.1. L'effet des traitements vs l'effet du génotype

Les traitements post-récolte ont été les facteurs prépondérants en vue de l'amélioration de la capacité de panification tandis que le facteur génotype a eu une influence moins importante. L'analyse de la taille des granules et des paramètres RVA (PV1 et PV2) a

montré que la fermentation a un effet plus prononcé sur la structure des granules d'amidon, que le séchage au soleil. La combinaison des deux traitements est néanmoins nécessaire pour obtenir une expansion plus élevée de la pâte. Ces résultats confirment plusieurs études antérieures (Bertolini *et al.*, 2000; Bertolini, Mestres, Lourdin, *et al.*, 2001; Guerra-Dias *et al.*, 2011; Marcon *et al.*, 2009; Mestres *et al.*, 1997) qui montrent que la fermentation et le séchage au soleil provoquent une dépolymérisation oxydative entrainant une diminution de la viscosité RVA et des viscosités intrinsèques ainsi qu'une augmentation de la capacité de panification. Cependant, aucune corrélation linéaire définitive n'a été trouvée entre la dépolymérisation (mesurée par la viscosité intrinsèque et la teneur en groupements carbonyle et carboxyle) et la capacité de panification. Une explication possible, est que d'autres facteurs entrent en jeu.

1.2. La teneur en amylose

La teneur en amylose a influencé négativement l'expansion de la pâte, probablement en raison de la formation de complexes amylose-lipide. Ainsi, la sélection de génotypes de manioc à faible teneur en amylose peut favoriser la qualité de la panification. Cette hypothèse pourrait être confirmée à partir de mesures de capacités de panification de génotypes de manioc sans amylose récemment découverts (Rolland-Sabaté *et al.*, 2013).

1.3. L'influence des lipides dans la recette du pain

Les capacités de panification observées dans la formulation boulangère contenant des lipides ont été inférieures à celles obtenues sans lipides (formulation HPMC), ce qui pourrait s'expliquer par la présence des complexes amylose-lipide. En effet, ces complexes inhibent le gonflement de la pâte du pain. La présence de lipides peut donc influencer négativement l'expansion de la pâte.

1.4. L'effet de l'altitude de culture

Lors du traitement par fermentation, les variétés de plaine et d'altitude montrent des sensibilités différentes, confirmées notamment par la modification de la taille des granules, les résultats RVA et les analyses de viscosité intrinsèque. Ces observations nous ont conduits à l'idée que, pour comprendre les phénomènes qui sous-tendent la capacité de panification de l'amidon de manioc aigre, il est important de faire une distinction entre les niveaux moléculaire et supramoléculaire.

En premier lieu, au niveau moléculaire, la fermentation et le séchage au soleil entrainent la dépolymérisation des chaînes d'amidons. Ces traitements, en réduisant la viscosité, participent à l'augmentation de la capacité de panification de la pâte au cours de l'expansion. Un modèle d'expansion de bulles a été proposé par Fan, Mitchell, & Blanshard

(1999) et a permis de prédire le volume de gonflement de la pâte à différents temps de cuisson. Différents modèles (Hailemariam, Okos, & Campanella, 2007) montrent que d'autres phénomènes peuvent aussi avoir des effets significatifs sur la capacité de panification à différentes étapes de cuisson : transferts de masse (i.e. migration du CO_2 ou de l'eau de la matrice vers les bulles en expansion), inertie calorifique, et tension superficielle.

En second lieu, au niveau supramoléculaire, nos résultats indiqueraient que les variétés de plaine et d'altitude présentent une dépolymérisation différente. Les variétés de plaine seraient altérées principalement en surface, conduisant à des granules plus petits et renfermant des molécules d'amidon quasi intactes ayant des poids moléculaires élevés. Les variétés d'altitude, en revanche, seraient dépolymérisées dans l'ensemble de la structure du granule avec comme conséquence une diminution du poids moléculaire, améliorant ainsi la panification par une désagrégation plus complète des granules lors de la gélatinisation et une meilleure formation de film autour des bulles de vapeur en expansion dans la pâte.

2. Travaux complémentaires pour confirmer l'effet de la fermentation sur la structure du granule d'amidon.

Les analyses de digestibilité enzymatique, de la porosité et de microscopie électronique effectuées sur les échantillons étudiés n'ont pas permis de confirmer l'effet de la fermentation sur la structure du granule d'amidon. Ainsi :

1. Les analyses de porosité à l'hélium et au mercure effectuées sur quelques échantillons ne montrent pas de modification de la porosité des granules d'amidon.
2. Les observations par MEB et EMEB des échantillons analysés n'ont pas montré de dégradations sur la surface des granules lors de la fermentation.
3. Les expériences de digestibilité enzymatique réalisées sur certains échantillons n'ont pas démontré que le granule d'amidon est plus sensible à l'attaque par α-amylase après fermentation.

On peut donc supposer, soit que la fermentation n'a pas d'effet sur la structure du granule, soit que la dégradation de l'amidon due à la fermentation est trop faible pour être détectée par les techniques utilisées. Par exemple, des travaux effectués en observation par microscopie électronique signalent des dégradations superficielles de moins de 1% des granules d'amidon de manioc après fermentation (Camargo *et al.*, 1988; Plata-Oviedo & Camargo, 1998).

Utiliser d'autres techniques plus sensibles pourrait permettre de détecter la dégradation des granules d'amidon due à la fermentation. Par exemple la détermination de la surface spécifique du granule d'amidon par adsorption du gaz BET pourrait caractériser de

façon plus fine la porosité dans l'amidon de manioc natif et hydrolysé (Chen, Huang, Tang, Chen, & Zhang (2011)). Également, des observations à haute résolution de la surface et de la structure interne des granules peuvent être effectuées par Microscopie à Force Atomique comme l'ont montré Juszczak, Fortuna, & Krok (2003) dans un travail sur l'amidon de manioc.

3. Perspectives

3.1. Rôle de l'amylopectine pour la capacité de panification

Les résultats de viscosité intrinsèque ainsi que les travaux antérieurs indiquent que l'amylopectine est partiellement dégradée au cours du traitement de fermentation-irradiation. Toutefois, les paramètres DSC ainsi que les résultats de diffraction par rayons X d'un nombre limité d'échantillons révèlent que ces traitements n'ont pas modifié la structure cristalline de l'amidon de manioc (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001). Des travaux complémentaires de diffraction aux rayons X et d'analyses DSC avec un nombre plus important d'échantillons, seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer un tel comportement. Par ailleurs, les analyses ATR-FTIR sur l'ensemble des échantillons n'ont pas permis de déterminer, à une profondeur de pénétration entre 2,6 et 1,7 µm, un effet sur le degré de cristallinité de l'amidon consécutif aux traitements ou au lieu de culture.

Enfin, si la dégradation induite par ces traitements de fermentation et/ou irradiation UV n'est pas mise en évidence dans les régions cristallines du granule d'amidon, elle pourrait se limiter aux régions amorphes (Bertolini, Mestres, Raffi, *et al.*, 2001). L'amylopectine jouerait, donc, un rôle mineur tandis que l'amylose serait un facteur déterminant pour prédire le pouvoir de panification, comme cela a déjà été mentionné. Pour une meilleure compréhension de l'effet des traitements sur la teneur en amylose, des analyses complémentaires pourraient être envisagées. Toutefois, une récente étude (Franco *et al.*, 2010) montre que la fermentation-irradiation UV n'influence pas la teneur en amylose.

Afin de compléter la compréhension du rôle de l'amylopectine, la détermination de l'effet de la fermentation et irradiation UV sur la distribution de tailles des chaînes latérales de ce polymère par « débranchage » enzymatique (isoamylase) suivi d'une séparation chromatographique de type « anion exchange » (HPAEC) peut être envisagée. Une étude récente (Franco *et al.*, 2010) utilisant la technique HPAEC-ENZ-PAD a montré une augmentation de la proportion des chaînes moyennes et longues et une diminution de la proportion des chaînes courtes lors de traitements de fermentation et/ou irradiation UV.

3.2. Travaux complémentaires

Des travaux complémentaires, d’une part pour caractériser la solubilité de l'amidon, et d’autre part pour établir un procédé standardisé de fermentation associé à un traitement UV à l’échelle du laboratoire pourraient améliorer la compréhension des phénomènes aux niveaux moléculaire et supramoléculaire en contrôlant mieux les propriétés de panification lors de la fermentation et du séchage au soleil.

La combinaison de différents génotypes de manioc (par exemple par la teneur en amylose) et des opérations de fermentation et de séchage au soleil devraient permettre d’adapter les propriétés de l’amidon de manioc aigre pour ouvrir de nouvelles perspectives de développement de produits sans gluten de type boulangerie (pain, pâte à pizza, etc.) ou "snacks". Par ailleurs, la maitrise technologique des procédés d'obtention de l’amidon aigre ouvre une porte intéressante, notamment en Amérique Latine, pour la diminution des importations de blé, sauvegardant ainsi leur économie et leur souveraineté agroalimentaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Adeyemi, I. A., & Beckley, O. (1986). Effect of period of maize fermentation and souring on chemical properties and amylograph pasting viscosity of ogi. *Journal of Cereal Science*, *4*(4), 353–360. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80039-X

Akanbi, C. T., Ade-Omowaye, B. I., Ojo, A., & Adeyemi, I. A. (2003). Effect of processing factors on rheological properties of ogi. *International Journal of Food Properties*, *6*(3), 405–418. doi:10.1081/JFP-120020118

Alarcón, F., & Dufour, D. (1998). Producción y recomendaciones. In CIAT-CIRAD (Ed.), *Almidón agrio de yuca en Colombia* (p. 35). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.

Alshebani, A., Pera-Titus, M., Landrivon, E., Schiestel, T., Miachon, S., & Dalmon, J.-A. (2008). Nanocomposite MFI – Ceramic hollow fibres: Prospects for CO2 separation. *Microporous and Mesoporous Materials*, *115*(1–2), 197–205. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.11.050

Alves, A. A. C. (2002). Cassava botany and physiology. In R. J. Hillocks, J. M. Tres, & A. C. Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, Production and Utilization* (pp. 67–89). New York: CABI Publishing.

American Asssociation of Cereal Chemist. (1983a). Method 44-01.01. Calculation of percent moisture . Reapproved November 3, 1999. In *Aproved methods of the American Asssociation of Cereal Chemist* (10th ed., p. 1200). St. Paul, Minn., USA. doi:http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-44-01.01

American Asssociation of Cereal Chemist. (1983b). Method 02-52.01. Hydrogen-ion activity (pH)—electrometric method. Reapproved November 3, 1999. In *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists* (10th ed., p. 1200). St. Paul, MN., USA. doi:http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-02-52.01

Ampe, F., Sirvent, A., & Zakhia, N. (2001). Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, *65*(1-2), 45–54. doi:10.1016/S0168-1605(00)00502-X

Angellier-Coussy, H., Putaux, J.-L., Molina-Boisseau, S., Dufresne, A., Bertoft, E., & Pérez, S. (2009). The molecular structure of waxy maize starch nanocrystals. *Carbohydrate Research*, *344*(12), 1558–1566. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.04.002

Aplevicz, K. S., & Demiate, I. M. (2007). Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. *Food Science and Technology (Campinas)*, *27*, 478–484. doi:10.1590/S0101-20612007000300009

Asaoka, M., Blanshard, J. M. V., & Rickard, J. E. (1991). Seasonal effects on the physico-chemical properties of starch from four cultivars of cassava. *Starch - Stärke*, *43*(12), 455–459. doi:DOI: 10.1002/star.19910431202

Atwell, W. A., Hood, L. F., Lineback, D. R., Varriano-Marston, E., & Zobel, H. F. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal foods world.*, *33*(3), 306.

Baker, A. A., Miles, M. J., & Helbert, W. (2001). Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*, *330*(2), 249–256. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00275-5

Baldwin, P. M., Adler, J., Davies, M. C., & Melia, C. D. (1994). Holes in Starch Granules: Confocal, SEM and Light Microscopy Studies of Starch Granule Structure. *Starch - Stärke*, *46*(9), 341–346. doi:10.1002/star.19940460906

Baldwin, P. M., Davies, M. C., & Melia, C. D. (1997). Starch granule surface imaging using low-voltage scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, *21*(1–2), 103–107. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00048-2

Banks, W., & Greenwood, C. T. (1975). *Starch and its components* (p. 342). Edinburgh (England): University Press. doi:10.1002/star.19750270912

Bemiller, J. N. (1997). Starch modification: challenges and prospects. *Starch - Stärke*, *49*(4), 127–131. doi:10.1002/star.19970490402

BeMiller, J. N., & Whistler, R. (2009). *Starch: chemistry and technology*. (J. BeMiller & R. Whistler, Eds.) (Third Edit., p. 894). San Diego: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00024-0

Bertolini, A. C. (2000). *Bases moléculaires et thermomécaniques de la propriété d'expansion du polvilho azedo*. Université de Nantes, Nantes, France. Thèse de doctorat.

Bertolini, A. C. (2010). *Starches: characterization, properties, and applications*. (A. C. Bertolini, Ed.) (p. 288). Boca Raton, USA: CRC Press.

Bertolini, A. C., Mestres, C., & Colonna, P. (2000). Rheological properties of acidified and UV-irradiated starches. *Starch - Stärke*, *52*(10), 340–344. doi:http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X(200010)52:10%3C340::AID-STAR340%3E3.0.CO

Bertolini, A. C., Mestres, C., Colonna, P., & Raffi, J. (2001). Free radical formation in UV- and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydrate polymers.*, *44*(3), 269–271. doi:10.1016/S0144-8617(00)00268-X

Bertolini, A. C., Mestres, C., Lourdin, D., Valle, G. Della, & Colonna, P. (2001). Relationship between thermomechanical properties and baking expansion of sour cassava starch (Polvilho azedo). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(4), 429–435. doi:http://dx.doi.org/10.1002/1097-0010(200103)81:4%3C429::AID-JSFA833%3E3.0.CO

Bertolini, A. C., Mestres, C., Raffi, J., Buleon, A., Lerner, D., & Colonna, P. (2001). Photodegradation of cassava and corn starches. *Journal of agricultural and food chemistry*, *49*(2), 675–682. doi:DOI: 10.1021/jf0010174

Betancur, D. A., Ancona, L. A. C., Guerrero, R. I., Camelo Matos, G., & Ortiz, D. (2001). Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (Phaseolus lunatus) starch. *Starch - Stärke*, *53*(5), 219–226. doi:10.1002/1521-379X(200105)53:5<219::AID-STAR219>3.0.CO;2-R

Biliaderis, C. G. (1982). Physical characteristics, enzymatic digestibility, and structure of chemically modified smooth pea and waxy maize starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *5*, 925–930. doi:DOI: 10.1021/jf00113a029

Biliaderis, C. G., Maurice, T. J., & Vose, J. R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, *45*(6), 1669–1674. doi:10.1111/j.1365-2621.1980.tb07586.x

Biliaderis, C. G., & Zawistowsi, J. (1990). Viscoelastic behavior of aging starch gels : effects of concentration, temperature, and starch hydrolysates on network properties. *Cereal chemistry*, *67*(3), 240–246.

Blanshard, J. M. V. (1987). Starch granule structure and function: a physicochemical approach. In T. Galliard (Ed.), *Starch: Properties and Potentials* (pp. 17–54). Chichester: John Wiley.

Blazek, J., & Gilbert, E. P. (2010). Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. *Biomacromolecules*, *11*(12), 3275–3289. doi:10.1021/bm101124t

Bloksma, A. H. (1990). Rheology of the breadmaking process. *Cereal foods world*, *35*(2), 228–236.

Brabet, C. (1994). *Études des mécanismes physico-chimiques et biologiques responsables du pouvoir de panification de l'amidon fermenté de manioc*. Université Montpellier II. Thèse de doctorat.

Brabet, C., Chuzel, G., Dufour, D., & Raimbault, M. (1996). Improving cassava sour starch quality in Colombia. In D. Dufour, G. M. O'Brien, & R. Best (Eds.), *Cassava flour and Starch : Progress in research and development* (pp. 241–246). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.

Brittain, H. G. (2006). UV/VIS reflectance spectroscopy. In H. G. Brittain (Ed.), *Spectroscopy of Pharmaceutical Solids* (pp. 121–149). New York, USA: Taylor & Francis. doi:doi:10.1201/9780849361333.ch5

Bryjak, J. (1999). Enzymatic production of maltodextrins and syrup solids from starch. Part I. Enzymes. *Biotechnologia*, *1*, 180–200.

Buléon, A., Colonna, P., & Leloup, V. (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Industries alimentaires et agricoles*, *107*(6), 515–532.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *23*(2), 85–112. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3

Buléon, A., Véronèse, G., & Putaux, J. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian Journal of Chemistry*. doi:http://dx.doi.org/10.1071/CH07168

Caballero-Vera, H., Villafuerte, J., & Poats, S. V. (1997). Transfer and adaptation of colombian sour cassava starch technology to Uatappy cassava producer processors in Manabi, Ecuador. *African journal of root and tuber crops*, *2*, 253–257.

Camargo, C., Colonna, P., Buleon, A., & Richard-Molard, D. (1988). Functional properties of sour cassava (Manihot utilissima) starch: polvilho azedo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *45*(3), 273–289. doi:DOI: 10.1002/jsfa.2740450311

Cárdenas, O. S., & de Buckle, T. S. (1980). Sour cassava starch production: a preliminary study. *Journal of Food Science*, *45*(6), 1509–1512. doi:DOI: 10.1111/j.1365-2621.1980.tb07551.x

Carlson, T. L.-G., Larsson, K., Dinh-Nguyen, N., & Krog, N. (1979). A study of the amylose-monoglyceride complex by raman spectroscopy. *Starch - Stärke*, *31*(7), 222–224. doi:10.1002/star.19790310703

Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2007). *Technology of Breadmaking* (2nd ed., p. 397). New York, USA: Springer.

Cavallini, C. M., & Franco, C. M. L. (2010). Effect of acid-ethanol treatment followed by ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch. *Starch Stärke*, *62*(5), 236–245. doi:10.1002/star.200900231

Ceballos, H., Sánchez, T., Denyer, K., Tofiño, A. P., Rosero, E. A., Dufour, D., … Fahy, B. (2008). Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (Manihot esculenta Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 7215–7222. doi:DOI: 10.1021/jf800603p

Cereda, M. P. (1973). *Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca*. Universidade do Estado de São Paulo (UNESP). Botucatu, São Paulo, Brazil. PhD disertation.

Cereda, M. P. (1983). Padronizaçao para ensaio de qualidade da fécula de mancioca fermentada. *Boletin de la Sociedade Brasilera de ciencia e Tecnologia de Alimentos*, *17*, 287–296.

Chan, H. T., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Physicochemical and functional properties of ozone-oxidized starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(13), 5965–5970. doi:10.1021/jf9008789

Chatelet, J. (1996). Systèmes optroniques semi-actifs. Application du laser à la granulométrie. In *Techniques de l'ingénieur* (p. 6). Paris: Techinques de l'ingenieur.

Chen, J., Lai, V. M.-F., & Lii, C. (2003). Effects of compositional and granular properties on the pasting viscosity of rice starch blends. *Starch - Stärke*, *55*(5), 203–212. doi:10.1002/star.200390039

Chen, Y., Huang, S., Tang, Z., Chen, X., & Zhang, Z. (2011). Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α-amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, *85*(1), 272–275. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.047

Chuzel, G. (2001). Mobiliser les savoirs locaux dans une démarche de technologie expérimentale. L'amidon aigre de manioc en Colombie = Sour cassava starch in Columbia. Mobilising local knowledge in an experimental technological venture. *Etudes et Recherches sur les Systèmes Agraires et le Développement*, *32*, 81–96.

Ciacco, C. F., & D'Appolonia, B. L. (1977). Characterization of starches from various tubers and their use in bread-baking. *Cereal chemistry*, *54*, 1096–1108.

Cooke, D., & Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, *227*, 103–112. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(92)85063-6

Cornford, S. J. (1969). Volume and crumb firmness measurements in bread and cake. In *Flour Milling and Baking Research Association* (Vol. 25, p. 14). Rickmansworth, Herts: FMBRA.

Curá, J. A., Jansson, P.-E., & Krisman, C. R. (1995). Amylose is not strictly linear. *Starch - Stärke*, *47*(6), 207–209. doi:10.1002/star.19950470602

Czerny, M., & Turner, A. F. (1930). About the astigmatism in mirror spectrometers (in german). *Zeitschrift für Physik*, *61*(11-12), 792–797. doi:10.1007/BF01340206

Da, G., Dufour, D., Giraldo Toro, Andres , Moreno, M., Tran, T., Velez, G., Sanchez, T., … Marechal, P.-A. (2012). Cottage level cassava starch processing systems in Colombia and Vietnam. *Food and Bioprocess Technology*, 1–10. doi:10.1007/s11947-012-0810-0

Da Silva, G. de O., Takizawa, F. F., Pedroso, R. A., Franco, C. M. L., Leonel, M., Sarmento, S. B. S., & Demiate, I. M. (2006). Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *26*, 188–197. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100030

Dandekar, A. Y. (2010). Porosity. In *Petroleum Reservoir Rock and Fluid Properties* (pp. 19–34). Boca Raton, USA: CRC Press.

De Sena Aquino, A. C. M., Pereira, J. M., Watanabe, L. B., & Amante, E. R. (2013). Standardisation of the sour cassava starch reduces the processing time by fermentation water monitoring. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(9), 1892–1898. doi:10.1111/ijfs.12167

Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico-chemical properties of cassava starch. *StarchStärke*, *50*(2-3), 58–64. doi:10.1002/(SICI)1521-379X(199803)50:2/3<58::AID-STAR58>3.0.CO;2-N

Demiate, I. M., Dupuy, N., Huvenne, J. P., Cereda, M. P., & Wosiacki, G. (2000). Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, *42*(2), 149–158. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00152-6

Di Benedetto, D. (2007). Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. In *Techniques de l'ingénieur Spectrométries* (p. 20). Paris: Techinques de l'ingenieur.

Doerry, W. T. (1995). *Breadmaking Technology* (Chapters 4., pp. 62–162). Manhattan, KS: American Institute of Baking.

Donovan, J. W. (1979). Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers*, *18*(2), 263–275. doi:10.1002/bip.1979.360180204

Doublier, J. L., Llamas, G., & Le Meur, M. (1987). A rheological investigation of cereal starch pastes and gels. Effect of pasting procedures. *Carbohydrate Polymers*, *7*(4), 251–275. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(87)90063-4

Dufour, D., Brabet, C., Zakhia, N., & Chuzel, G. (1995). Influence of fermentation and sun-drying on the breadmaking capacity of cassava sour starch. In *ORSTOM* (Vol. 62, pp. 399–416).

Dufour, D., Lafond, M. D., Lambert, B., & Blary, D. (1993). *Valorisation du manioc* (p. 322). Montpellier: CIRAD-SAR.

Dufour, D., Larsonneur, S., Alarcon Morante, F., Brabet, C., & Chuzel, G. (1996). Improving the breadmaking potential of cassava sour starch. In D. Dufour, G. M. O'Brien, & R. Best (Eds.), *Cassava flour and Starch: Progress in research and development* (pp. 133–142). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.

Duprat, F., Gallant, D. ., Guilbot, A., Mercier, C., & Robin, F. P. (1980). L'amidon. In B. Monties (Ed.), *Les polymères végétaux* (pp. 176–231). Paris: Gautiers-Villars.

Eggleston, G., Omoaka, P. E., & Ihedioha, D. O. (1992). Development and evaluation of products from cassava flour as new alternatives to wheaten breads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *59*(3), 377–385. doi:10.1002/jsfa.2740590315

Emiola, L. O., & Delarosa, L. . C. (1981). Physicochemical characteristics of yam starches. *Journal of Food Biochemistry*, *5*(2), 115–130. doi:10.1111/j.1745-4514.1981.tb00665.x

Erdogan, A., & Gurses, M. (2005). Lactic acid bacteria isolating from blue mouldy tulum cheese produced with Penicillium roqueforti. *International Journal of Food Properties*, *8*(2), 405–411. doi:10.1081/JFP-200059509

Escobar, A., Dufour, E., Sanchez, T., Giraldo, A., & Dufour, D. (2009). Evaluation of highland cassava (Manhiot esculenta Crantz) for starch production in Colombia. *Alimentos Hoy : Revista de la Asociacion colombiana de ciencia y tecnologia de alimentos. Congreso Iberoamericano de Ingenieria en Alimentos. Bogota, Colombia 06-09 September*, *18*, 5.

Essendoubi, M. (2007). *Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures du genre Candida d'origine clinique*. Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat.

Fan, J., Mitchell, J. R., & Blanshard, J. M. V. (1996a). The effect of sugars on the extrusion of maize grits: I. The role of the glass transition in determining product density and shape. *International Journal of Food Science & Technology*, *31*(1), 55–65. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.22-317.x

Fan, J., Mitchell, J. R., & Blanshard, J. M. V. (1996b). The effect of sugars on the extrusion of maize grits: II. Starch conversion. *International Journal of Food Science & Technology*, *31*(1), 67–76. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.21-318.x

Fan, J., Mitchell, J. R., & Blanshard, J. M. V. (1999). A model for the oven rise of dough during baking. *Journal of Food Engineering*, *41*(2), 69–77. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00070-9

Fang, C., & Campbell, G. M. (2000). Effect of measurement method and moisture content on wheat kernel density measurement. *Food and Bioproducts Processing*, *78*(4), 179–186. doi:http://dx.doi.org/10.1205/09603080051065278

Fannon, J. E., Hauber, R. J., & Bemiller, J. N. (1992). Surface pores of starch granules. *Cereal chemistry*, *69*, 284–288.

Fannon, J. E., Shull, J. M., & Bemiller, J. N. (1993). Interior channels of starch granules. *Cereal chemistry*, *70*(5), 611–613.

FAO. (2000). *The world cassava economy*. *Fao* (Vol. 45, p. 64). Rome: FAO.

FAO. (2004). Domestic market opportunities. In *Global cassava market study Business opportunities for the use of cassava* (6th ed., p. 184). Rome: FAO.

FAO. (2006). *Le marché de l'amidon valorise le manioc* (p. 2). Rome: FAO.

FAO. (2013). *FAOSTAT data*.

Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry* (3rd ed., p. 1069). New York: Marcel Dekker Inc.

Fiedorowicz, M., Tomasik, P., You, S., & Lim, S.-T. (1999). Molecular Distribution and Pasting Properties of UV-Irradiated Corn Starches. *Starch - Stärke*, *51*(4), 126–131. doi:10.1002/(SICI)1521-379X(199904)51:4<126::AID-STAR126>3.0.CO;2-N

Fortuna, T., Juszczak, L., Kujawski, M., & Palasinski, M. (2000). Porosity of starch granules and their susceptibility to the action of bacterial apha-amylase (in Polish). *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej, Cracow*, *12*(367), 51–64.

Franco, C. M. L., Cabral, R. A. F., & Tavares, D. Q. (2002). Structural and physicochemical characteristics of lintnerized native and sour cassava starches. *Stärke*, *54*(10), 469–475. doi:DOI: 10.1002/1521-379X(200210)54:10<469::AID-STAR469>3.0.CO;2-Z

Franco, C. M. L., Ciacco, C. F., & Tavares, D. Q. (1988). Studies on the susceptibility of granular cassava and corn starches to enzymatic attack. Part 2: study of the granular structure of starch. *Starch - Stärke*, *40*(1), 29–32. doi:DOI: 10.1002/star.19880400108

Franco, C. M. L., Ogawa, C., Rabachini, T., Rocha, T. de S., Cereda, M. P., & Jane, J. (2010). Effect of lactic acid and UV irradiation on the cassava and corn starches. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*, 443–454. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200025

French, D. (1984). Organization of starch granules. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller, & E. F. Paschall (Eds.), *Starch: Chemistry and technology* (pp. 183–242). New York: Academic Press.

Fuwa, H., Takaya, T., & Sugimoto, Y. (1980). Degradation of various starch granules by amylases. In J. J. Marshall (Ed.), *Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization* (pp. 73–100). New York: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-474150-8.50010-0

Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(3–4), 143–152. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.012

Gallant, D. J., Bewa, H., Buy, Q. H., Bouchet, B., Szylit, O., & Sealy, L. (1982). On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. *Starch - Stärke*, *34*(8), 255–262. doi:DOI: 10.1002/star.19820340803

Gallant, D. J., Bouchet, B., & Baldwin, P. M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, *32*(3-4), 177–191. doi:10.1016/S0144-8617(97)00008-8

Gallant, D. J., Bouchet, B., Buléon, A., & Pérez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur J. Clin Nutr.*, *46*(2), 3–16.

Gallant, D. J., Derrien, A., Aumaitre, A., & Guilbot, A. (1973). Dégradation in vitro de l'amidon par le suc pancréatique. Etude par microscopie électronique à transmission et à balayage. *Starch - Stärke*, *25*(2), 56–64. doi:10.1002/star.19730250206

Gallant, D. J., Mercier, C., & Guilbot, A. (1972). Electron microscopy of starch granules modified by bacterial alpha-amylase. *Cereal Chemistry Journal*, *49*, 354–365.

Gan, Z., Angold, R. E., Williams, M. R., Ellis, P. R., Vaughan, J. G., & Galliard, T. (1990). The microstructure and gas retention of bread dough. *Journal of Cereal Science*, *12*(1), 15–24. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80153-7

Gan, Z., Ellis, P. R., & Schofield, J. D. (1995). Gas Cell Stabilisation and Gas Retention in Wheat Bread Dough. *Journal of Cereal Science*, *21*(3), 215–230. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1995.0025

Garcia, V., Colonna, P., Bouchet, B., & Gallant, D. J. (1997). Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. *Starch - Stärke*, *49*(5), 171–179. doi:10.1002/star.19970490502

Gelders, G. G., Vanderstukken, T. C., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2004). Amylose–lipid complexation: a new fractionation method. *Carbohydrate Polymers*, *56*(4), 447–458. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.012

Gérard, G., & Gérard, G. (1998). Diffusion des faisceaux laser par des particules. *Techniques de l'ingénieur Optique physique*, 14.

Gernat, C., Radosta, S., Damaschun, G., & Schierbaum, F. (1990). Supramolecular structure of legume starches revealed by X-ray scattering. *Starch - Stärke*, *42*(5), 175–178. doi:10.1002/star.19900420504

Gidley, M. J. (1985). Quantification of the structural features of starch polysaccharides by n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, *139*, 85–93. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(85)90009-6

Godon, B., Popineau, Y., & Ducarouge, F. (1981). Différences d'hydrophobicité de surface des gliadines de deux variétés de blé dur de bonne et de mauvaise qualité. *Agronomie*, *1*(2), 77–82. doi:10.1051/agro:19810202

Gomes, A. M. M., Mendes da Silva, C. E., & Ricardo, N. M. P. S. (2005). Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydrate Polymers*, *60*(1), 1–6. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.016

Grosmaire, L., Reynès, C., & Sabatier, R. (2013). Joint selection of wavenumber regions for MidIR and RAMAN spectra and variables in PLS regression using Genetic Algorithms. *Journal de la Société Française de Statistique*, *154*(3), 80–94.

Guerra-Dias, A. R., Zavareze, E. da R., Elias, M. C., Helbig, E., da Silva, D. O., & Ciacco, C. F. (2011). Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 268–275. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.033

Guilbot, A., & Mercier, C. (1985). Starch. In G. O. Aspinall (Ed.), *The polysaccharides, Volume 3* (p. 470). Orlando: Academic Press.

Guyot, J. P., Brizuela, M. A., Rodriguez Sanoja, R., & Morlon-Guyot, J. (2003). Characterization and differentiation of Lactobacillus manihotivorans strains isolated from cassava sour starch. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(1–2), 187–192. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00048-5

Hailemariam, L., Okos, M., & Campanella, O. (2007). A mathematical model for the isothermal growth of bubbles in wheat dough. *Journal of Food Engineering*, *82*(4), 466–477. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.006

Han, X.-Z., & Hamaker, B. R. (2001). Amylopectin fine structure and rice starch paste breakdown. *Journal of Cereal Science*, *34*(3), 279–284. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0374

Harding, S. E. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in biophysics and molecular biology*, *68*(2-3), 207–262.
Helbert, W., Schülein, M., & Henrissat, B. (1996). Electron microscopic investigation of the diffusion of Bacillus licheniformis alpha-amylase into corn starch granules. *Int J Biol Macromol*, *19*(3), 165–169. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0141-8130(96)01123-3
Hennig, H. J., Lechert, H., & Goemann, W. (1976). Examination of the swelling mechanism of starch by pulsed NMR-method. *Starch - Stärke*, *28*(1), 10–13. doi:10.1002/star.19760280103
Hill, R. D., & Dronzek, B. L. (1973). Scanning Electron Microscopy studies of wheat, potato and corn starch during gelatinization. *Starch - Stärke*, *25*(11), 367–372. doi:10.1002/star.19730251104
Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, *141*(2), 295–306. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90461-0
Hizukuri, S., Abe, J., & Hanashiro, I. (2006). Starch: analytical aspects. In A.-C. Eliasson (Ed.), *Carbohydrates in Foods* (Second., p. 526). Boca Raton, USA: Taylor & Francis.
Hizukuri, S., & Maehara, Y. (1990). Fine structure of wheat amylopectin: the mode of A to B chain binding. *Carbohydrate Research*, *206*(1), 145–159. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(90)84013-K
Hizukuri, S., & Takagi, T. (1984). Estimation of the distribution of molecular weight for amylose by the low-angle laser-light-scattering technique combined with high-performance gel chromatography. *Carbohydrate Research*, *134*(1), 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(84)85017-X
Hizukuri, S., Takeda, Y., Maruta, N., & Juliano, B. O. (1989). Molecular structures of rice starch. *Carbohydrate Research*, *189*, 227–235. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(89)84099-6
Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., & Suzuki, A. (1981). Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, *94*(2), 205–213. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80718-1
Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, *45*(3), 253–267. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00260-5
Hoover, R., & Zhou, Y. (2003). In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α-amylase and resistant starch formation in legumes—a review. *Carbohydrate Polymers*, *54*(4), 401–417. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00180-2
Hoseney, R. C. (1992). Physical chemistry of bread dough. In H. G. Schwartzberg & R. W. Hartel (Eds.), *Physical Chemistry of Foods* (pp. 443–457). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
Hoseney, R. C., & Seib, P. A. (1978). Bread: From grain to table. *Cereal Foods World*, *23*, 262.
Huang, Z.-Q., Lu, J.-P., Li, X.-H., & Tong, Z.-F. (2007). Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. *Carbohydrate polymers*, *68*(1), 128–135. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.017
Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, *41*(3), 269–276. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00145-9
Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., & Péerez, S. (1991). Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch - Stärke*, *43*(10), 375–384. doi:10.1002/star.19910431002
Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buleon, A., & Tran, V. (1987). New three-dimensional structure for A-type starch. *Macromolecules*, *20*(10), 2634–2636. doi:10.1021/ma00176a054
Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Bulèon, A., & Tran, V. (1988). The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *Journal of Molecular Biology*, *201*(2), 365–378. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(88)90144-1
Imberty, A., & Pérez, S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers*, *27*(8), 1205–1221. doi:10.1002/bip.360270803

Jacobson, M. R., Obanni, M., & Bemiller, J. N. (1997). Retrogradation of starches from different botanical sources. *Cereal Chemistry Journal*, *74*(5), 511–518. doi:10.1094/CCHEM.1997.74.5.511

Jamroz, J., Hajnos, M., & Sokolowska, Z. (1999). Application of the mercury porosimetry to the porosity study of wheat flour extrudates. *International Agrophysics*, *13*(4), 445–449.

Jane, J. (2006). Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience*, *53*(3), 205–213.

Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M., & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry Journal*, *76*(5), 629–637. doi:10.1094/CCHEM.1999.76.5.629

Jane, J., Xu, A., Radosavljevic, M., & Seib, P. A. (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. *Cereal chemistry.*, *69*(4), 405–409.

Jang, J. K., & Pyun, Y. R. (1997). Effect of moisture level on the crystallinity of wheat starch aged at different temperatures. *Starch - Stärke*, *49*(7-8), 272–277. doi:10.1002/star.19970490705

Jaska, E. (1971). Starch gelatinization as detected by proton magnetic resonance. *Cereal Chemistry Journal*, *48*, 437–444.

Jenkins, P. J. (1994). *X-ray and neutron scattering studies of starch granule structure*. Cambridge University, UK. PhD tesis.

Jinapong, N., Suphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, *84*(2), 194–205. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032

Jobling, S. A. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(2), 210–218. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001

Juszczak, L., Fortuna, T., & Krok, F. (2003). Non-contact Atomic Force Microscopy of starch granules surface. Part I. potato and tapioca starches. *Starch - Stärke*, *55*(1), 1–7. doi:10.1002/star.200390012

Juszczak, L., Fortuna, T., & Wodnicka, K. (2002a). Porosity of starch granules of different origin. *Polish journal of food and nutrition sciences*, *11*(2), 29–34.

Juszczak, L., Fortuna, T., & Wodnicka, K. (2002b). Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. *Journal of Food Engineering*, *54*(2), 103–110. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00190-X

Karathanos, V. T., & Saravacos, G. D. (1993). Porosity and pore size distribution of starch materials. *Journal of Food Engineering*, *18*(3), 259–280. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0260-8774(93)90090-7

Kassenbeck, P. (1975). Electron microscope contribution to the study of fine structure of wheat starch (in german). *Starch - Stärke*, *27*(7), 217–227. doi:10.1002/star.19750270702

Kassenbeck, P. (1978). Contribution to the knowledge on distribution of amylose and amylopectin in starch granules (in german). *Starch - Stärke*, *30*(2), 40–46. doi:10.1002/star.19780300203

Katz, J. (1930). Changes in the X-ray spectrum of the starch during cooking and on the staling of bread (in german). *Z. Physik. Chem*, *150*, 37–59.

Kent, N. L. (1985). *Technical compendium on composite flours: Technologies available for application*. (FAO, Ed.) (Addis Abab., p. 109). Economic Commission for Africa.

Kimura, A., & Robyt, J. F. (1995). Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase. *Carbohydrate Research*, *277*(1), 87–107. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(95)00196-Z

Kokelaar, J. J., van Vliet, T., & Prins, A. (1996). Strain Hardening Properties and Extensibility of Flour and Gluten Doughs in Relation to Breadmaking Performance. *Journal of Cereal Science*, *24*(3), 199–214. doi:http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1996.0053

Krishna Kumari, S., & Thayumanavan, B. (1998). Characterization of starches of proso, foxtail, barnyard, kodo, and little millets. *Plant Foods for Human Nutrition*, *53*(1), 47–56 LA – English. doi:10.1023/A:1008083020810

Kuakpetoon, D., & Wang, Y.-J. (2006). Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content. *Carbohydrate Research*, *341*(11), 1896–1915. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.013

Lacerda, I. C. A., Miranda, R. L., Borelli, B. M., Nunes, Á. C., Nardi, R. M. D., Lachance, M.-A., & Rosa, C. A. (2005). Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(2), 213–219. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.010

Lai, H.-M., & Lin, T.-C. (2006). Bakery Products: Science and Technology. In *Bakery Products* (pp. 3–68). Blackwell Publishing. doi:10.1002/9780470277553.ch1

Landraf, F. (2002). Produits et procédés de panification. *Techniques de l'ingénieur Filière de production: produits d'origine végétale*, 1–16.

Laurant, L. (1992). *Qualité de l'amidon aigre de manioc: validation d'une méthode d'évaluation du pouvoir de panification et mise en place d'une épreuve descriptive d'analyse sensorielle* (p. 68). Projet de fin d'études. Génie biologique, produits biologiques et alimentaires, Université de technologie de Compiègne. Compiègne, France.

Lawal, O. S. (2004). Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidised, acetylated and acid-thinned new cocoyam (Xanthosoma sagittifolium) starch. *Food Chemistry*, *87*(2), 205–218. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.11.013

Leach, H. W., & Schoch, T. J. (1961). Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches. *Cereal Chemistry Journal*, (38), 34–46.

Lelievre, J., Lewis, J. A., & Marsden, K. (1986). The size and shape of amylopectin: a study using analytical ultracentrifugation. *Carbohydrate Research*, *153*(2), 195–203. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90262-3

LeMeste, M., Huang, V. T., Panama, J., Anderson, G., & Lentz, R. (1992). Glass transition of bread. *Cereal foods world*, *37*(3), 264–267.

Léotard, G., Duputié, A., Kjellberg, F., Douzery, E. J. P., Debain, C., de Granville, J.-J., & McKey, D. (2009). Phylogeography and the origin of cassava: New insights from the northern rim of the Amazonian basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *53*(1), 329–334. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.003

Létang, C., Piau, M., & Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour–water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, *41*(2), 121–132. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00082-5

Li, J. H., Vasanthan, T., Hoover, R., & Rossnagel, B. G. (2004). Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food chemistry*, *84*(4), 621–632. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00287-5

Li, M. J., Rogers, K., & Rust, C. A. (1995). Environmental scanning electron microscopes. *Advanced Materials and Processes*, *141*(7), 24–26.

Limpisut, P., & Jindal, V. K. (2002). Comparison of rice flour pasting properties using Brabender viscoamylograph and rapid visco analyser for evaluating cooked rice texture. *Starch - Stärke*, *54*(8), 350–357. doi:10.1002/1521-379X(200208)54:8<350::AID-STAR350>3.0.CO;2-R

Lineback, D. R., & Inglett, G. E. (Eds.). (1982). *Food carbohydrates* (p. 494). Westport, Connecticut (USA): The Avi Publishing Company, Inc.

Lintner, C. . (1886). Studies of diastase (in german). *J. Prakt chem*, *34*, 378–386.

Liu, C.-Y., Sheperd, K. W., & Rathjen, A. J. (1996). Improvement of durum wheat pastamaking and breadmaking qualities. *Cereal chemistry*, *73*(2), 155–166.

Lund, D., & Lorenz, K. J. (1984). Influence of time, temperature, moisture, ingredients, and processing conditions on starch gelatinization. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *20*(4), 249–273. doi:10.1080/10408398409527391

MacRitchie, F. (1989). Identifying the bakoing quality related components of wheat flours. *Cereal Foods World*, *34*, 548.
Malvern Instruments. (2005). Mastersizer 2000 Brochure (pp. 1–12). Worcestershire, UK: Malvern Instruments.
Manners, D. J. (1989). Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, *11*(2), 87–112. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(89)90018-0
Marcon, M. J. A., Kurtz, D. J., Maraschin, M., Reginatto, V., Demiate, I., & Amante, E. R. (2011). A simplified method for determination of the sour cassava starch expansion property. In *International Congress on Engineering and Food (poster presentation)* (p. 5). Athens.
Marcon, M. J. A., Kurtz, D. J., Raguzzoni, J. C., Delgadillo, I., Maraschin, M., Soldi, V., … Amante, E. R. (2009). Expansion properties of sour cassava starch (polvilho azedo): variables related to its practical application in bakery. *Starch - Stärke*, *61*(12), 716–726. doi:http://dx.doi.org/10.1002/star.200900132
Marcon, M. J. A., Vieira, G. C. N., Simas, K. N. de, Santos, K., Vieira, M. A., Amboni, R. D. de M. C., & Amante, E. R. (2007). Effect of the improved fermentation on physicochemical properties and sensorial acceptability of sour cassava starch. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(6), 1073–1081. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000700018
Marousis, S. N. (1989). *Effect of porosity on the water diffisivity in drying granular starches.* Rutgers University, USA. PhD thesis.
Marousis, S. N., Karathanos, V. T., & Saravacos, G. D. (1991). Effect of physical structure of starch materials on water diffusivity. *Journal of Food Processing and Preservation*, *15*(3), 183–195. doi:10.1111/j.1745-4549.1991.tb00165.x
Marousis, S. N., & Saravacos, G. D. (1990). Density and porosity in drying starch materials. *Journal of Food Science*, *55*(5), 1367–1372. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb03939.x
Matos Segura, M. E., & Perez Sira, E. E. (2003). Characterization of native and modified cassava starches by scanning electron microscopy and X-ray diffraction techniques. *Cereal foods world*, *48*(2), 78–81.
McCleary, B. V., Gibson, T. S., & Mugford, D. C. (1997). Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase-α-amylase method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, *80*(3), 571–579.
Mendes Da Silva, C. E., Ciacco, C. F., Barberis, G. E., Solano, W. M. R., & Rettori, C. (1996). Starch gelatinization measured by pulsed nuclear magnetic resonance. *Cereal Chemistry Journal*, *73*(3), 297–301.
Mestres, C. (1996). Los estados fisicos del almidón. In *Conferencia Internacional de Almidón. Propriedades Físico-quimicas, funcionales y nutricionales* (p. 16). Quito, Ecuador: Escuela Politecnica Nacional.
Mestres, C., Boungou, O., Akissoë, N., & Zakhia, N. (2000). Comparison of the expansion ability of fermented maize flour and cassava starch during baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(6), 665–672. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<665::AID-JSFA585>3.0.CO;2-K
Mestres, C., & Rouau, X. (1997). Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *74*(2), 147–155. doi:http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2%3C147::AID-JSFA781%3E3.0.CO;2-J
Mestres, C., Rouau, X., Zakhia, N., & Brabet, C. (1996). Physicochemical properties of cassava sour starch. In D. Dufour, G. M. O'Brien, & R. Best (Eds.), *Cassava flour and starch : Progress in research and development* (pp. 143–149). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.
Mestres, C., Zakhia, N., & Dufour, D. (1997). Functional and physico-chemical properties of sour starch. In P. J. Frazier, P. Richmond, & A. M. Donald (Eds.), *Starch: Structure and Functionality* (Special pu., pp. 42–50). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Meuser, F., Manners, D. J., & Seibel, W. (1995). *Progress in plant polymeric carbohydrate research*. *Progress in Plant Polymeric Carbohydrate Research* (pp. 54–56). Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co.

Meyer, K., Lorenz, P., Böhl-Kuhn, B., & Klobes, P. (1994). Porous solids and their characterization methods of investigation and application. *Crystal Research and Technology*, *29*(7), 903–930. doi:10.1002/crat.2170290702

Micromeritics. (2001a). *MultiVolume Pycnometer 1305* (p. 15). Creli, France: Micromeritics.

Micromeritics. (2001b). *Automated mercury porosimeters: AutoPore IV Series* (pp. 1–6). Norcross, U.S.A.: Micromeritics.

Mina, J., Valadez-González, A., Herrera-Franco, P., Zuluaga, F., & Delvasto, S. (2011). Physicochemical characterization of natural and acetylated thermoplastic cassava starch. *DYNA rev.fac.nac.minas*, *78*(166), 174–182.

Mishra, S., & Rai, T. (2006). Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids*, *20*(5), 557–566. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.001

Miyazaki, M., Van Hung, P., Maeda, T., & Morita, N. (2006). Recent advances in application of modified starches for breadmaking. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(11), 591–599. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.002

Moorthy, S. N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. *Starch - Stärke*, *54*(12), 559–592. doi:http://dx.doi.org/10.1002/1521-379X(200212)54:12%3C559::AID-STAR2222559%3E3.0.CO

Moorthy, S. N. (2004). Tropical sources of starch. In Ann-Charlotte Eliasson (Ed.), *Starch in food: structure, function and applications* (pp. 321–359). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.

Moorthy, S. N., & Maini, S. B. (1982). Varietal differences on the properties of cassava starch. In *Proc. Seminar on Post Harvest Technology of Cassava, AFST (I)* (pp. 71–74). Trivandrum, India.

Moorthy, S. N., Wenham, J. E., & Blanshard, J. M. V. (1996). Effect of solvent extraction on the gelatinisation properties of flour and starch of Five cassava varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *72*(3), 329–336.

Morrison, W. R., & Karkalas, J. (1990). Starch. In P. M. Dey & J. B. Harborne (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 2, pp. 323–352). New York, USA: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-461012-5.50015-X

Morrison, W. R., & Karkalas, J. (1996). Molecular biology. In J. A. Bryant (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* (p. 126). Virginia, U.S.A.: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-461012-5.50001-X

Mutungi, C., Onyango, C., Doert, T., Paasch, S., Thiele, S., Machill, S., … Rohm, H. (2011). Long- and short-range structural changes of recrystallised cassava starch subjected to in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, *25*(3), 477–485. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.023

Nakamura, I. M., & Park, Y. K. (1975). Some physico-chemical properties of fermented cassava starch ("polvilho azedo"). *Starch - Stärke*, *27*(9), 295–297. doi:DOI: 10.1002/star.19750270904

Newport Scientific. (2001). Rapid Visco Analyser Series 4 (RVA-4): Installation and operation manual (p. 45). Warriewood, Australia: Newport Scientific.

Niba, L. L., Bokanga, M. M., Jackson, F. L., Schlimme, D. S., & Li, B. W. (2002). Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various Manihot esculenta (cassava) genotypes. *Journal of Food Science*, *67*(5), 1701–1705. doi:DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08709.x

Niemann, C., & Whistler, R. L. (1992). Effect of acid hydrolysis and ball milling on porous corn starch. *Starch - Stärke*, *44*(11), 409–414. doi:10.1002/star.19920441103

Numfor, F. A., Walter, W. M., & Schwartz, S. J. (1995). Physicochemical changes in cassava starch and flour associated with fermentation: effect on textural properties. *Starch - Stärke*, *47*(3), 86–91. doi:DOI: 10.1002/star.19950470303

Nunes, O. L. G. S., & Cereda, M. P. (1994). Metodologia para avaliacçao da qualidade de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). In *Proceeding of the Congresso Brasileiro de Mandioca*. Salvador, Bahia, Brazil.

Nuwamanya, E., Baguma, Y., Emmambux, N., & Taylor, J. (2010). Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan varieties and their progenies. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *2*(1), 1–11.

Nwokocha, L. M., Aviara, N. A., Senan, C., & Williams, P. A. (2009). A comparative study of some properties of cassava (Manihot esculenta, Crantz) and cocoyam (Colocasia esculenta, Linn) starches. *Carbohydrate Polymers*, *76*(3), 362–367. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.034

Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, *8*(11), 375–382. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01090-X

Obanni, M., & Bemiller, J. N. (1997). Properties of some starch blends. *Cereal Chemistry Journal*, *74*(4), 431–436. doi:10.1094/CCHEM.1997.74.4.431

Okechukwu, P. E., & Anandha Rao, M. (1996). Kinetics of cowpea starch gelatinization based on granule swelling. *Starch - Stärke*, *48*(2), 43–47. doi:10.1002/star.19960480203

Olsen, K. M., & Schaal, B. A. (1999). Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of Manihot esculenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(10), 5586–5591. doi:10.1073/pnas.96.10.5586

Ong, M. H., Jumel, K., Tokarczuk, P. F., Blanshard, J. M. V, & Harding, S. E. (1994). Simultaneous determinations of the molecular weight distributions of amyloses and the fine structures of amylopectins of native starches. *Carbohydrate Research*, *260*(1), 99–117. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(94)80025-1

Onitilo, M. O., Sanni, L. O., Oyewole, O. B., & Maziya-Dixon, B. (2007). Physicochemical and functional properties of sour starches from different cassava varieties. *International Journal of Food Properties*, *10*(3), 607–620. doi:10.1080/10942910601048994

Osungbaro, T. O., Jimoh, D., & Osundeyi, E. (2012). Functional and pasting properties of composite Cassava-Sorgum flour meals. *Agriculture and biology journal of north america*, *1*(4), 715–720.

Ottenhof, M.-A., & Farhat, I. A. (2004). Starch retrogradation. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, *21*, 215–228.

Owen, T. (1996). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy* (p. 139). Germany: Hewlett-Packard Company.

Paderewski, M. L. (1999). *Adsorption processes in chemical engineering (in polish)* (pp. 85–100). Warszaw, Poland: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.

Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, *2*(6), 559–572.

Peighambardoust, S. H., Fallah, E., Hamer, R. J., & van der Goot, A. J. (2010). Aeration of bread dough influenced by different way of processing. *Journal of Cereal Science*, *51*(1), 89–95. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.10.002

Pérez, E., Gibert, O., Rolland-Sabaté, A., Jiménez, Y., Sánchez, T., Giraldo, A., … Dufour, D. (2011). Physicochemical, functional, and macromolecular properties of waxy yam starches discovered from "mapuey" (Dioscorea trifida) genotypes in the venezuelan amazon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(1), 263–273. doi:10.1021/jf100418r

Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke*, *62*(8), 389–420. doi:10.1002/star.201000013

Planchot, V., Colonna, P., Gallant, D. J., & Bouchet, B. (1995). Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from aspergillus fumigatus. *Journal of Cereal Science*, *21*(2), 163–171. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0733-5210(95)90032-2

Plata-Oviedo, M., & Camargo, C. (1998). Effect of acid treatments and drying processes on physico-chemical and functional properties of cassava starch. *Journal of the Science of Food*

and Agriculture, *77*(1), 103–108. doi:DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<103::AID-JSFA10>3.0.CO;2-2
Plummer, J. G. (2001). Caractérisation des polymères par microscopie électronique. In *Techniques de l'ingénieur Plastochimie et analyse physico-chimique* (p. 11). Paris: Techniques de l'ingénieur.
Putri, W. D. R., Haryadi, D. W., & Marseno and Cahyanto, M. N. (2011). Effect of biodegradation by Lactic Acid Bacteria on physical properties of cassava starch. *International Food Research Journal*, *18*(3), 1149–1154.
Putri, W. D. R., Haryadi, Marseno, D. W., & Cahyanto, M. N. (2012). Role of lactic acid bacteria on structural and physicochemical properties of sour cassava starch. *APCBEE Procedia*, *2*, 104–109. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.019
Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, *51*(3), 238–247. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.011
Ramesh, M., Mitchell, J. R., Jumel, K., & Harding, S. E. (1999). Amylose Content of Rice Starch. *Starch - Stärke*, *51*(8-9), 311–313. doi:10.1002/(SICI)1521-379X(199909)51:8/9<311::AID-STAR311>3.0.CO;2-E
Ramirez Asheri, D. P., & Vilela, E. R. (1995). Alteracoes do polvilho de mandioca pela fermentacao, no fabrico de biscoitos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *30*(2), 269–279.
Rappenecker, G., & Zugenmaier, P. (1981). Detailed refinement of the crystal structure of Vh-amylose. *Carbohydrate Research*, *89*(1), 11–19. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85225-8
Rasper, V., Rasper, J., & Mabey, G. (1974). Functional properties of nonwheat flour substitutes in composite flours. I. the effect of non-wheat starches on composite dough. *Food Technology*, *7*, 86–92.
Relkin, P. (2006). Microcalorimétrie à balayage DSC. Application agroalimentaire. In *Techniques de l'ingénieur* (pp. 1–16). Paris, France: Techniques de l'ingénieur.
Rickard, J. E., Asaoka, M., & Blanshard, J. M. V. (1991). The physicochemical properties of cassava starch. *Tropical Science*, *31*(2), 189–207.
Robin, J.-P. (1976). *Comportement du grain d'amidon à l'hydrolyse acide ménagée. Etude physico-chimique enzymatique de la fraction insoluble. Contribution à la connaissance de la structure de l'amylopectine.* Université Pierre et Marie Curie. Thèse de doctorat d'état.
Robyt, J. F. (1984). Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller, & E. F. Paschall (Eds.), *Starch chemistry and technology* (2nd ed., pp. 87–124). Orlando, Fl: Academic Press.
Rocha, T. de S., Carneiro, A. P. de A., & Franco, C. M. L. (2010). Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *30*, 544–551. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000200039
Roger, P., & Colonna, P. (1993). Evidence of the presence of large aggregates contaminating amylose solutions. *Carbohydrate Polymers*, *21*(2–3), 83–89. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(93)90002-L
Roger, P., & Colonna, P. (1996). Molecular weight distribution of amylose fractions obtained by aqueous leaching of corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, *19*(1), 51–61. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0141-8130(96)01101-4
Rolland-Sabaté, A., Sanchez, T., Buléon, A., Colonna, P., Ceballos, H., Zhao, S.-S., … Dufour, D. (2013). Molecular and supra-molecular structure of waxy starches developed from cassava (Manihot esculenta Crantz). *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1451–1462. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.048
Rolland-Sabaté, A., Sánchez, T., Buléon, A., Colonna, P., Jaillais, B., Ceballos, H., & Dufour, D. (2012). Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 161–174. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.008

Ross, A. S., Walker, C. E., Booth, R. I., Orth, R. A., & Wrigley, C. W. (1987). The Rapid Visco Analyser: A new technique for the estimation of sprout damage. *Cereal Foods World*, *32*, 827–829.
Russell, P. L., & Oliver, G. (1989). The effect of pH and NaCl content on starch gel ageing. A study by differential scanning calorimetry and rheology. *Journal of Cereal Science*, *10*(2), 123–138. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(89)80041-4
Ruste, J. (2013). Microscopie électronique à balayage. Principe et équipement. *Techniques de l'ingénieur Techniques d'analyse par imagerie*, 21.
Sahin, S., & Gülüm Sumnu, S. (2006). *Physical properties of foods* (p. 267). New York, USA: Springer.
Sánchez, T., Salcedo, E., Ceballos, H., Dufour, D., Mafla, G., Morante, N., … Moreno, I. X. (2009). Screening of starch quality traits in cassava (Manihot esculenta Crantz). *Starch Stärke*, *61*(1), 12–19. doi:10.1002/star.200800058
Sandstedt, R. M. (1961). The function of starch in baking of bread. *Baker's Digest*, *35*, 36–44.
Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., & Mikami, B. (2000). Comparison of degradation abilities of α- and β-amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, *35*(7), 711–715. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00133-8
Sarko, A., & Zugenmaier, P. (1980). Crystal structures of amylose and Its derivatives. In A. D. French & K. H. Gardner (Eds.), *Fiber Diffraction Methods* (Vol. 141, pp. 459–482). Washington, USA: American Chemical Society. doi:doi:10.1021/bk-1980-0141.ch028
Sasaki, T., Yasui, T., & Matsuki, J. (2000). Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. *Cereal Chemistry Journal*, *77*(1), 58–63. doi:10.1094/CCHEM.2000.77.1.58
Schulz, H., & Baranska, M. (2009). Chapter 12 - Fruits and Vegetables. In D.-W. Sun (Ed.), *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (pp. 321–353). San Diego: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00012-2
Seib, P. A. (1994). Wheat Starch: Isolation, Structure and Properties. *Journal of Applied Glycoscience*, *41*(1), 49–69.
Sevenou, O., Hill, S. E., Farhat, I. A., & Mitchell, J. R. (2002). Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, *31*(1-3), 79–85. doi:10.1016/S0141-8130(02)00067-3
Sevenou, O., Hill, S. E., Pesheck, P., Enz, J., & Mitchell, J. R. (2002). From dough to bread: The end of a foam. *Paper presented at: AACC annual meeting and exhibition (Montreal, Quebec, Canada)*.
Shafer, J., & Neasham, J. (2000). Mercury porosimetry protocol for rapid determination of petrophysical and reservoir quality properties. *The Society of Core analysts*, 12.
Shibanuma, K., Takeda, Y., Hizukuri, S., & Shibata, S. (1994). Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, *25*(2), 111–116. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(94)90146-5
Shimadzu Corporation. (1999a). *Manuel d'instructions. Guide utilisateur système. Spectrophomètre UV-2450 UV-2550* (p. 62). Kyoto, Japan: Shimadzu Corporation.
Shimadzu Corporation. (1999b). *Instruction manual ISR-240A Integrating sphere assembly* (p. 24). Kyoto, Japan: Shimadzu Corporation.
Shimelis, E. A., Meaza, M., & Rakshit, S. (2006). Physico-chemical properties, pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties grown in east africa. *Agricultural Engineering*, *8*, 1–18.
Shirai, M. A., Haas, Â., Ferreira, G. F., Matsuguma, L. S., Franco, C. M. L., & Demiate, I. M. (2007). Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos modificados por tratamento oxidativo. *Food Science and Technology (Campinas)*, *27*, 239–247. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200005
Shore, K. (2002). Decades of cassava research bear fruit. *Gene Conserve*, *1*, 1–4.
Sigma-Aldrich. (2007). Complex carbohydrate analysis : enzymes, kits and reagents. *Biofiles*, *2*(3), 29.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., & Morrill, T. C. (1998). *Identification spectrométrique de composés organiques* (1ère ed., p. 420). Bruxelles: De Boeck.
Simsek, S., Baek, H., Hareland, G., Ohm, J.-B., & Eun Jung, L. (2011). Effect of hydroxypropyl methylcellulose on breadmaking. *Cereal Crops Research*, 136.
Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., & Siemieniewska, T. (1985). Reporting physisorption data for gas/solid systems, with special reference to the determination of surface area and porosity (recommendations 1984). *Pure and applied chemistry*, *57*(4), 603–619. doi:10.1002/9783527610044.hetcat0065
Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*, *21*(1), 1–22.
Singh, V., & Ali, S. Z. (1987). Estimation of phosphorus in native and modified starches. Improvement in the Molybdovanadophosphoric Acid Method. *Starch - Stärke*, *39*(8), 277–279. doi:10.1002/star.19870390806
Sivak, N. M., & Preiss, J. (1998). Physicochemical structure of the starch granule. In M. N. Sivak & J. Preiss (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. 13–32). London: Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60046-7
Slade, L., & Levine, H. (1995). Glass transitions and water-food structure interactions. (J. E. K. and S. L. T. B. T.-A. in F. and N. Research, Ed.)*Advances in Food & Nutrition Research*, *38*, 103–269. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60084-4
Smith, R. J. (1967). Characterization and analysis of starches. In R. L. Whistler & U. F. Pachall (Eds.), *Starch Chemistry and Technology* (Vol. II, pp. 620–625). New York, USA: Academic Press.
Sokal, R. R., & Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin*, *38*, 1409–1438.
Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2004). Gelatinization kinetics of rice starch studied by non-isothermal calorimetric technique: influence of extraction method, water concentration and heating rate. *Journal of Food Engineering*, *62*(4), 337–344. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00248-6
Sriroth, K., Piyachomkwan, K., Wanlapatit, S., & Oates, C. G. (2000). Cassava starch technology: the Thai experience. *Starch - Stärke*, *52*(12), 439–449. doi:10.1002/1521-379X(200012)52:12<439::AID-STAR439>3.0.CO;2-E
Sriroth, K., Piyachomwan, K., Sangseethong, K., & Oates, C. (2002). Modification of cassava starch. In *Paper presented at X International Starch Convention, 11-14 June 2002* (p. 14). Cracow, Poland.
Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawong, K., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (1999). Cassava starch granule structure–function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, *38*(2), 161–170. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00117-9
Stampfli, L., & Nersten, B. (1995). Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*, *52*(4), 353–360. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)93281-U
Stapleton, G. (2012). Global starch market outlook and competing starch raw materials for starches by product segment and region. In *Cassava Starch World 2012. Centre for Management Technology (CMT)*. Phnom Penh, Cambodia.
Stevens, D. J., & Elton, G. A. H. (1971). Thermal properties of the starch/water system part I. measurement of heat of gelatinisation by differential scanning calorimetry. *Starch - Stärke*, *23*(1), 8–11. doi:10.1002/star.19710230104
Sujka, M., & Jamroz, J. (2007). Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *International agrophysics*, *21*(1), 107–113.
Susuki, A., Takeda, Y., & Hizukuri, S. (1985). Relationship between the molecular structures and retrogradation of tapioca, potato and kuzu starches. *J. Jap. Soc. Starch Sci*, (32), 205–212.
Swinkels, J. J. M. (1985). Composition and properties of commercial native starches. *Starch - Stärke*, *37*(1), 1–5. doi:10.1002/star.19850370102

Szymońska, J., Krok, F., Komorowska-Czepirska, E., & Rębilas, K. (2003). Modification of granular potato starch by multiple deep-freezing and thawing. *Carbohydrate Polymers*, *52*(1), 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00263-1

Takeda, Y., Hizukuri, S., & Juliano, B. O. (1987). Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, *168*(1), 79–88. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(87)80008-3

Takeda, Y., Hizukuri, S., Takeda, C., & Suzuki, A. (1987). Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydrate Research*, *165*(1), 139–145. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(87)80089-7

Takeda, Y., Maruta, N., Hizukuri, S., & Juliano, B. O. (1989). Structures of indica rice starches (IR48 and IR64) having intermediate affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, *187*(2), 287–294. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(89)80009-6

Takeda, Y., Shibahara, S., & Hanashiro, I. (2003). Examination of the structure of amylopectin molecules by fluorescent labeling. *Carbohydrate Research*, *338*(5), 471–475. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00488-3

Takeda, Y., Shirasaka, K., & Hizukuri, S. (1984). Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography. *Carbohydrate research*, *132*(1), 83–92. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(84)85066-1

Takeda, Y., Shitaozono, T., & Hizukuri, S. (1988). Molecular Structure of Corn Starch. *Starch - Stärke*, *40*(2), 51–54. doi:10.1002/star.19880400204

Tara, A. (2005). *Modification chimique de l'amidon par extrution reactive*. Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat.

Tawil, G., Viksø-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., & Buléon, A. (2010). In depth study of a new highly efficient raw starch hydrolyzing α-amylase from Rhizomucor sp. *Biomacromolecules*, *12*(1), 34–42. doi:10.1021/bm100913z

Taylor, J. R. N., Schober, T. J., & Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science*, *44*(3), 252–271. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.009

Tester, R. F., Debon, S. J. J., & Sommerville, M. D. (2000). Annealing of maize starch. *Carbohydrate Polymers*, *42*(3), 287–299. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00170-8

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, *39*(2), 151–165. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001

Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1992). Swelling and gelatinization of cereal starches. III. Some properties of waxy and normal nonwaxy barley starches. *Cereal Chemistry*, *69*(6), 654–658.

Thomas, D., & Atwell, W. (1988). *Starches*. (American Association of Cereal Chemists (AACC), Ed.) (p. 94). St. Paul, Minn. U.S.A.: Eagan Press.

Thomson, N. H., Miles, M. J., Ring, S. G., Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1994). Real-time imaging of enzymatic degradation of starch granules by atomic force microscopy. In *The 1993 international conference on scanning tunneling microscopy* (Vol. 12, pp. 1565–1568). Beijing, China: AVS.

Tollier, M.-T., & Guilbort, A. (1971). Caractéristiques de la fraction glucidique des échantillons de maïs grain. *Ann. Zootech.*, *20*, 633–640. doi:DOI: 10.1051/animres:19710504

Tran, T., Piyachomkwan, K., & Sriroth, K. (2007). Gelatinization and thermal properties of modified cassava starches. *Starch - Stärke*, *59*(1), 46–55. doi:10.1002/star.200600514

Tran, T., Sanz Hernandez, J. B., Bellassee, B., Da, G., Luong, H. N., Wansuksri, R., … Dufour, D. (2009). Physico-chemical and functional properties of under-utilized starches in South-East Asia. In *Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology*. Bangkok, Thailand. 24-25/09/2009.

Uthumporn, U., Shariffa, Y. N., & Karim, A. A. (2012). Hydrolysis of native and heat-treated starches at sub-gelatinization temperature using granular starch hydrolyzing enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(5), 1167–1182 LA – English. doi:10.1007/s12010-011-9502-x

Uthumporn, U., Zaidul, I. S. M., & Karim, A. A. (2010). Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food and Bioproducts Processing*, *88*(1), 47–54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.10.001

Uzomah, A., & Ibe, C. (2011). The functional properties, pasting and baking behaviour of chemically modified sour cassava starches. *African Journal of Food Science*, *5*(12), 686–694.

Valetudie, J.-C., Colonna, P., Bouchet, B., & Gallant, D. J. (1993). Hydrolysis of tropical tuber starches by bacterial and pancreatic α-amylases. *Starch - Stärke*, *45*(8), 270–276. doi:DOI: 10.1002/star.19930450805

Valetudie, J.-C., Guadeloupe, L., Colonna, P., Bouchet, B., & Gallant, D. J. (1995). Gelatinization of sweet potato, tania and yam tuber starches. *Starch - Stärke*, *47*(8), 298–306. doi:10.1002/star.19950470804

Van Soest, J. J. G., Tournois, H., De Wit, D., & Vliegenthart, J. F. G. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance fourier-transform ir spectroscopy. *Carbohydrate research*, *279*, 201–214. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(95)00270-7

Vanhamel, S., Ende, L., Darius, P. L., & Delcour, J. A. (1991). A volumeter for breads prepared from 10 grams of flour. *Cereal chemistry.*, *68*(2), 170–172.

Varatharajan, V., Hoover, R., Li, J., Vasanthan, T., Nantanga, K. K. M., Seetharaman, K., … Chibbar, R. N. (2011). Impact of structural changes due to heat-moisture treatment at different temperatures on the susceptibility of normal and waxy potato starches towards hydrolysis by porcine pancreatic alpha amylase. *Food Research International*, *44*(9), 2594–2606. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.050

Vatanasuchart, N., Naivikul, O., Charoenrein, S., & Sriroth, K. (2005). Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohydrate polymers*, *61*(1), 80–87. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.012

Waigh, T. A., Gidley, M. J., Komanshek, B. U., & Donald, A. M. (2000). The phase transformations in starch during gelatinisation: a liquid crystalline approach. *Carbohydrate Research*, *328*(2), 165–176. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00098-7

Waigh, T. A., Kato, K. L., Donald, A. M., Gidley, M. J., Clarke, C. J., & Riekel, C. (2000). Side-chain liquid-crystalline model for starch. *Starch - Stärke*, *52*(12), 450–460. doi:10.1002/1521-379X(200012)52:12<450::AID-STAR450>3.0.CO;2-5

Wakelin, J. H., Virgin, H. S., & Crystal, E. (1959). Development and comparison of two X-ray methods for determining the crystallinity of cotton cellulos. *Journal of Applied Physics*, *30*(11). doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.1735031

Walker, C. W., Ross, A. S., Wrigley, C. W., & McMaster, G. J. (1998). Accelerated starch-paste characterization with the Rapid Visco-Analyzer. *Cereal Foods World*, *33*, 491–494.

Wang, L., & Wang, Y.-J. (2001). Structures and physicochemical properties of acid-thinned corn, potato and rice starches. *Starch - Stärke*, *53*(11), 570–576. doi:10.1002/1521-379X(200111)53:11<570::AID-STAR570>3.0.CO;2-S

Wang, T. L., Bogracheva, T. Y., & Hedley, C. L. (1998). Starch: as simple as A, B, C? *Journal of Experimental Botany*, *49*(320), 481–502. doi:10.1093/jxb/49.320.481

Washburn, E. W. (1921). The dynamics of capillary flow. *Physical Review*, *17*(3), 273–283.

Watson, S. A. (1964). Determination of starch gelatinization temperature. In R. L. Whistler (Ed.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 240–242). New York, USA: Academic Press.

Weissenborn, P. K. (1996). Behaviour of amylopectin and amylose components of starch in the selective flocculation of ultrafine iron ore. *International journal of mineral processing*, *47*(3-4), 197–211. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0301-7516(95)00096-8

Westby, A., & Cereda, M. P. (1994). Production of fermented cassava starch (polvilho azedo) in Brazil. *Tropical science.*, *34*(2), 203–210.

Whitehurst, R. J. (2008). *Emulsifiers in food technology* (p. 264). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Wu, H.-C. H., & Sarko, A. (1978a). The double-helical molecular structure of crystalline a-amylose. *Carbohydrate Research*, *61*(1), 27–40. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84464-X

Wu, H.-C. H., & Sarko, A. (1978b). The double-helical molecular structure of crystalline b-amylose. *Carbohydrate Research*, *61*(1), 7–25. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84463-8

Würzburg, O. B. (1986). *Modified starches: Properties and uses* (p. 277). Boca Raton, USA: CRC Press.

Wuttisela, K., Shobsngob, S., Triampo, W., & Triampo, D. (2008). Amylose/amylopectin simple determination in acid hydrolyzed tapioca starch. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *53*, 1565–1567.

Wyszecki, G., & Stiles, S. W. (1983). *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae*. (G. Wyszecki & S. W. Stiles, Eds.)*Color Research & Application* (2nd ed., Vol. 8, p. 950). New York, USA: John Wiley and Sons. doi:10.1002/col.5080080421

Yamaguchi, M., Kainuma, K., & French, D. (1979). Electron microscopic observations of waxy maize starch. *Journal of Ultrastructure Research*, *69*(2), 249–261. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(79)90114-X

Yoo, S.-H., & Jane, J. (2002). Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydrate Polymers*, *49*(3), 307–314. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00339-3

Yu, S., Ma, Y., & Sun, D.-W. (2009). Impact of amylose content on starch retrogradation and texture of cooked milled rice during storage. *Journal of Cereal Science*, *50*(2), 139–144. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.003

Zakhia, N., Dufour, D., Chuzel, G., & Griffon, D. (1996). Review of sour cassava starch production in rural Colombian areas. *Tropical Science*, *36*(4), 247–255.

Zhong, Z., & Sun, X. S. (2005). Thermal characterization and phase behavior of corn starch studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Engineering*, *69*(4), 453–459. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.07.023

Zhou, W., & Therdthai, N. (2006). Manufacture. In *Bakery Products* (pp. 301–318). Blackwell Publishing. doi:10.1002/9780470277553.ch17

Zhou, Y., Hoover, R., & Liu, Q. (2004). Relationship between α-amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. *Carbohydrate Polymers*, *57*(3), 299–317. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.05.010

Zobel, H. F. (1988a). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch - Stärke*, *40*(1), 1–7. doi:10.1002/star.19880400102

Zobel, H. F. (1988b). Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch - Stärke*, *40*(2), 44–50. doi:http://dx.doi.org/10.1002/star.19880400203

Zobel, H. F., Young, S. N., & Rocca., L. A. (1998). Starch gelatinization: an X-ray diffraction study. *Cereal Chemistry Journal*, *65*, 443–446.

ANNEXES

Annexes.

Publication dans une revue à comité de lecture de rang A :

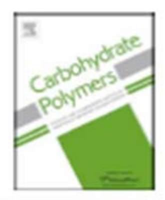
Carbohydrate Polymers 98 (2013) 1137–1146

Contents lists available at ScienceDirect



Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Combined effect of fermentation, sun-drying and genotype on breadmaking ability of sour cassava starch



Pedro Maldonado Alvarado[a], Lidwine Grosmaire[a,b,1], Dominique Dufour[a,c,d,*,1], Andrés Giraldo Toro[a,d], Teresa Sánchez[d], Fernando Calle[d], Martín Alonso Moreno Santander[e], Hernán Ceballos[d], Jean Louis Delarbre[a,b], Thierry Tran[a,f,g,1]

[a] Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR Qualisud, 34398 Montpellier, France
[b] Université Montpellier 1, UMR Qualisud, UFR Science Pharmaceutical & Biology, Montpellier, France
[c] CIRAD, UMR Qualisud, Cali, Colombia
[d] International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cassava Program, AA6713 Cali, Colombia
[e] Univalle, Mechanical Engineering Department, Cali, Colombia
[f] CIRAD, UMR Qualisud, Bangkok, Thailand
[g] Cassava and Starch Technology Research Unit (CSTRU), Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 April 2013
Received in revised form 7 June 2013
Accepted 3 July 2013
Available online 12 July 2013

Keywords:
Modified starch
Breadmaking
Loaf expansion
Gluten-free
UV irradiation

ABSTRACT

The influence of genotype and post-harvest treatments on expansion ability of sour cassava starch was investigated using 13 cassava genotypes from Colombia. Starches from cassava grown at 1000 m and 1700 m.a.s.l (3 lowland and 10 highland clones respectively) were modified by fermentation (0 or 30 days) and drying (oven or sun) treatments. RVA average peak viscosity decreased regularly from 952 cP in native starch to 699 cP in fermented and sun-dried starch. Granule size analysis revealed that fermentation hydrolysed lowland and highland granules by exocorrosion and endocorrosion respectively. This result was corroborated by significantly higher RVA breakdown and lower intrinsic viscosity in highland clones, reflecting different sensitivity to fermentation. For the first time, amylose contents ranging from 15.7 to 21.7% were correlated with expansion ability (3.0–8.6 mL/g) of sour cassava starch. Therefore the combination of cassava genotypes (mainly amylose content) and post-harvest treatments is key for expansion ability. Supra-molecular granule structure influenced sensitivity to fermentation.

1. Introduction

The Composite Flour Program of FAO established in 1964 (Kent, 1985) financed research in tropical countries to substitute wheat flour with cassava flour. Consumer acceptability decreased in mixtures with >30% cassava flour, due to noticeable color, texture, and flavor differences (FAO, 2004). In South America a traditional alternative to flour is the fermentation of cassava starch combined with sun-drying, which has excellent breadmaking capacity (Cereda, 1973; Westby & Cereda, 1994, in Brazil and Cárdenas & de Buckle, 1980 and Zakhia, Dufour, Chuzel & Griffon, 1996, in Colombia). These authors described the process to obtain fermented or sour starch ("Polvilho azedo" in Brazil or "Almidón agrio" in Colombia). In this process, the main steps are starch extraction, natural fermentation for about 30 days and final sun-drying for 12 h. The sour starch is used locally for bread and pastry production. There are also opportunities to use sour cassava starch as adjuvant for breadmaking or as the main ingredient for gluten-free breads. It is important, therefore, to understand better the mechanisms giving breadmaking ability of sour cassava starch.

Extensive works have been performed to develop a better understanding of breadmaking ability of sour starch (Dufour, Larsonneur, Alarcon Morante, Brabet, & Chuzel, 1996; Mestres & Rouau, 1997; Mestres, Rouau, Zakhia, & Brabet, 1996). Most studies focused on the effects of fermentation and sun-drying on the physicochemical properties and baking behavior such as pH, solubility, specific volume, polymerization degree through intrinsic viscosity measurements (Marcon et al., 2009); degree of starch oxidation through carbonyl and carboxyl content measurements (Guerra Dias et al., 2011); and starch paste thermomechanical properties (Bertolini, Mestres, Lourdin, Valle, & Colonna, 2001). Evidence from these studies suggests that a degradation mechanism of starch occurs during fermentation and that sun-drying plays a key role in the breadmaking properties. However, the nature

* Corresponding author at: CIAT, km 17 Recta Cali-Palmira, AA 6713 Cali, Colombia. Tel.: +57 2445 01 48; fax: +57 2445 00 73.
E-mail addresses: d.dufour@cgiar.org, dominique.dufour@cirad.fr (D. Dufour).
[1] These authors contributed equally to this work.

0144-8617/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.012

of the changes are not fully elucidated (Dufour, Brabet, Zakhia, & Chuzel, 1995). Two hypotheses have been suggested to explain the link between starch degradation and breadmaking ability: firstly at molecular level, free-radical formation results in starch oxidation and depolymerisation (Bertolini, Mestres, & Colonna, 2000; Bertolini, Mestres, Raffi, et al., 2001; Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda & Wosiacki, 2000; Guerra Dias et al., 2011; Vatanasuchart, Naivikul, Charoenrein, & Sriroth, 2005) or secondly at supramolecular level, the structure of the starch granules is altered and results in modified gelatinization behavior (Camargo, Colonna, Buleon, & Richard-Molard, 1988; Gomes, Mendes da Silva, & Ricardo, 2005; Onitilo, Sanni, Oyewole, & Maziya-Dixon, 2007).

In addition, few publications explored the influence of cassava genotype on breadmaking ability of sour starch (Escobar, Dufour, Sanchez, Giraldo, & Dufour, 2009; Onitilo et al., 2007) in contrast with most works which used only one or two genotypes and therefore did not take the into consideration the genetic differences. Escobar et al. (2009) in particular, found that the altitude above sea level at which cassava is cultivated appears to be another determining factor for the breadmaking ability. Farmers traditional knowledge has often indicated that genetic and climatic factors influence breadmaking ability.

The originality of this work is to study in detail the genetic effect on breadmaking ability of sour cassava starch using 13 Colombian genotypes, cultivated in exactly the same conditions at two locations with low-intermediate (1000 meters above sea level, m.a.s.l.) or high (1700 m.a.s.l.) altitudes and referred to respectively as lowland and highland. The effect of post-harvest treatments (fermentation and sun-drying of the 13 native starches), was analyzed through characterization of both native and modified starches. Physicochemical parameters, pasting and thermal properties were quantified in order to provide information on the degradation mechanism(s) of sour starch. The aim of this work was to contribute to a better understanding of sour cassava starch properties, and to highlight the effects of genotype, altitude and process (fermented versus native starches) parameters on the breadmaking ability.

2. Materials and methods

2.1. Genotypes and growing conditions

Thirteen cassava genotypes from the germplasm collection at the International Center for Tropical Agriculture (CIAT, Cali, Colombia) were grown in two locations in Cauca Department in Colombia. Most of these genotypes have been improved through conventional breeding approaches. Three lowland genotypes (HMC-1; CM6438-14; CM4574-7) were grown at Jamundi (altitude 1000 m.a.s.l.) and harvested at 12 months after planting (MAP). Ten highland genotypes (CM7436-7; CM7438-14; SM1498-4a; CM7138-7; SM7591-5; Cumbre 3; SM707-17; SM1495-5; SM1058-13; and Tambo 4) were grown in Morales (1700 m.a.s.l.) and harvested at 16 MAP. The difference in age of the plants at harvest time (4 months) was considered small enough to have no significant effect on starch properties, so that altitude and genotype effects were predominant. It is not convenient to grow the 13 genotypes in the two locations as lack of adaptation to one of the environments would result in data that is not useful on one hand, and distortion of conclusions of the study on the other.

2.2. Treatments experimental conditions

After harvest, all the casava roots were transported to a traditional factory (*Rallandería*) in Cauca Department (Colombia) for starch extraction, using the following operations: washing-peeling, rasping and extraction; whereby starch was drained off through sieving the mash under running water. After 24 h of decantation, the top liquid phase was discarded. The sediment was divided into four equal subsamples and subjected to four different treatments. The first subsample was oven-dried at 40 °C for 24 h to obtain native, non-fermented, oven-dried cassava starch (NO). The second subsample was sun-dried for about 12 h to obtain non-fermented, sun-dried starch (NS). The third and fourth subsamples were fermented together in an airtight PVC tank (100 L) at ambient temperature (35 °C) for 30 days. The tank was filled with the wet starch and a layer of fermented starch was added. After fermentation, the third subsample was oven-dried for 24 h at 40 °C to obtain fermented, oven-dried starch (FO), and the fourth part was sun-dried for 12 h to obtain fermented, sun-dried starch (FS).

2.3. Breadmaking test

Bread dough was prepared according to CIAT protocol (CIAT, unpublished protocol): 125 g of starch sample (12–13% moisture content), 75 g of "*Costeño*" cheese and 18.7 g of sunflower oil were hand mixed on a stainless steel plate. Secondly pre-gelatinized starch was prepared by mixing 37.25 g starch (dry matter), with 31.25 g of cold water, then slowly adding 31.25 g of boiling water while stirring with a spoon. The native starch mix and pregelatinized starch were blended homogeneously with 100 mL of cold water. From the resulting dough, 12 rings of 33 g were shaped, each with a perimeter of 18 cm and 2 cm thick. The doughs were baked in an oven at 260 °C for 13 min, and then cooled for 20 min under ambient conditions. The weights and volumes of the breads were measured with a scale and a pycnometer using cauliflower seeds, and averages of the 12 replications (1 replication = 1 ring) were calculated. Breadmaking ability (or bread expansion) was characterized as the ratio: bread volume/bread weight (mL/g).

2.4. Gelatinization temperature and amylose content

The methodology reported by Mestres and Rouau (1997) was used. DSC analyses were performed on a Perkin-Elmer DSC 7 device (Perkin-Elmer, Norwalk, VA) using sealed stainless-steel pans. The sample pan (10–11 mg of starch and 50 µL of lyso-phospholipid (Sigma, 2% w/v in water) and the reference pan (empty) were heated from 25 to 160 °C at 10 °C min^{-1}, held at 160 °C for 2 min, and then cooled to 60 °C at 10 °C min^{-1}. The temperatures of gelatinization (T_o, T_p and T_c) and enthalpies (ΔH) of each sample were determined on the thermograms. The gelatinization temperature range (ΔT) was calculated as ($T_c - T_o$) as described by Cavallini and Franco (2010). Amylose content was also measured from the energy of amylose–lysophospholipid complex formation. The analyses were performed in duplicate, and mean values were calculated.

2.5. Granular size

Starch granules average diameter was determined from the size distribution evaluated by laser diffraction (Malvern Mastersizer 2000E, Malvern, Worcestershire, UK). The sample was suspended in distilled water and pre-treated by ultrasound (30 s) in order to break down granules aggregates, according to Jinapong, Suphantharika, and Jamnong (2008). The obscuration was adjusted in the range 11–14% during the measurements. The Fraunhofer model for non-transparent particles was used for the size calculations, with the refractive index of the dispersant (water) set at 1.33. The analyses were performed in triplicates, and mean values were calculated.

2.6. Pasting properties

The methodology reported by Sánchez et al. (2009) was used. Hot starch dispersion viscosity profiles were obtained with a Rapid Visco Analyser model RVA-4 Series (Newport Scientific, Warriewood, Australia). Starch (1.25 g db) was dispersed in distilled water (23 cm^3) to yield a 5% suspension. Viscosity was recorded using the following temperature profile: holding at 50 °C for 1 min, heating from 50 °C to 90 °C at 6 °C min^{-1}, holding at 90 °C for 5 min and then cooling down to 50 °C at 6 °C min^{-1} with continuous stirring first at 960 rpm for 10 s and then at 160 rpm throughout the rest of the experiment. Eight parameters were measured on the visco-amylogram: pasting temperature and pasting time (PT and Pt), peak viscosity 1 (PV1: first viscosity peak after beginning of pasting), peak viscosity 2 (PV2: second viscosity peak after beginning of pasting), time of peak viscosity 1 and 2 (tPV1 and tPV2, respectively), lowest hot paste viscosity or holding strength (HS), final viscosity (FV). Five additional parameters were then calculated: cooking ability (CA) estimated as tPV2-Pt, breakdown (BD) estimated as PV2-HS, relative breakdown (RBD) estimated as (BD/PV2) × 100, setback (SB) estimated as FV-HS and relative setback (RSB) estimated by (SB/FV) × 100. The analyses were performed in duplicate, and mean values were calculated.

2.7. Intrinsic viscosity

A 3% starch solution was prepared by dissolving starch in potassium hydroxide solution (KOH 5 mol/L) and heated in a water bath at 95 °C for 10 min. The samples were stirred for 20 h (±10 min) on a roller mixer in a temperature-controlled room at 22 °C (±0.5 °C). The resulting solution was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. 2 mL were removed and diluted in 28 mL of distilled water to reduce KOH concentration to 0.33 mol/L and starch concentration to 2 mg/mL. This solution was filtered through a syringe filter (pore size 0.45 μm). 10 mL of the filtered solution were collected to carry out a serial dilution with distilled water and to determine the following concentrations: 2.0, 1.7, 1.4, 1.1, 0.8 mg starch/mL.

The intrinsic viscosity was measured for each diluted solution using an Ubbelohde viscometer (U-tube, size 2 mL, Shott Gerate Gmbh, Hofheim, Germany) immersed in a water bath at 35 °C. The analyses were performed with just a single replication. For each dilution, the flow time was recorded three times, after an initial 10 min period for temperature equilibration. Preliminary replication tests showed that flow times did not vary significantly between replications. The intrinsic viscosity (mL/g) was determined by extrapolation to zero concentration of the reduced and inherent viscosities (Harding, 1997).

2.8. Statistical analysis

Statistical signifcance of differences between sample means was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's test at 95% confidence level. When relevant, a multivariate cluster analysis was performed to identify groups of samples with similar characteristics, using the "average linkage method" based on the calculation of the distances between the averages of samples (Sokal & Michener, 1958) and groups thereof using Statistica v7.1 software (StatSoft, Maison-Alfort, France). The Principal Component Analysis (PCA) was carried out to identify groups of samples with similar characteristics and performed with The Unscrambler X 10.2 software (Camo).

Table 1
Loaf expansion of native, fermented and/or sun-dried cassava starches.

Genotype	Loaf expansion (mL/g)[y]			
	Treatments[z]			
	NO[z]	NS[z]	FO[z]	FS[z]
Lowland				
HMC-1	1.40(0.03)[a]	1.93(0.08)[b]	1.40(0.05)[a]	3.57(0.23)[c]
CM6438-14	1.71(0.04)[a]	1.76(0.05)[a]	1.55(0.05)[a]	4.02(0.35)[b]
CM4574-7	1.85(0.05)[a]	1.92(0.05)[a]	2.19(0.13)[a]	6.59(0.81)[b]
Highland				
CM7436-7	1.92(0.05)[a]	2.65(0.10)[b]	2.07(0.04)[a]	4.37(0.69)[c]
CM7438-14	1.94(0.06)[a]	2.11(0.04)[ab]	2.40(0.07)[b]	4.47(0.43)[c]
SM1498-4a	1.82(0.03)[a]	2.26(0.07)[a]	1.94(0.04)[a]	5.99(0.68)[b]
CM7138-7	1.96(0.06)[a]	3.72(0.07)[b]	2.15(0.05)[a]	6.17(0.39)[c]
SM7591-5	1.45(0.09)[a]	2.40(0.05)[b]	1.49(0.07)[a]	3.05(0.17)[c]
Cumbre 3	2.21(0.13)[a]	3.39(0.15)[b]	2.30(0.15)[a]	8.58(0.79)[c]
SM707-17	1.87(0.05)[a]	2.30(0.06)[b]	2.27(0.07)[b]	7.49(0.44)[c]
SM1495-5	2.12(0.07)[a]	2.79(0.08)[a]	2.51(0.17)[a]	7.57(1.38)[b]
SM1058-13	1.88(0.02)[a]	2.55(0.07)[b]	2.19(0.09)[ab]	5.29(0.48)[c]
Tambo 4	2.11(0.07)[a]	2.68(0.08)[b]	2.54(0.07)[ab]	7.92(0.68)[c]
Lowland	1.59(0.21)[a 1]	1.87(0.10)[a 1]	1.76(0.38)[a 1]	4.99(1.51)[b 1]
Highland	1.91(0.24)[a 2]	2.68(0.49)[b 2]	2.17(0.34)[a 2]	6.17(1.88)[c 2]
All genotypes	1.83(0.27)[a]	2.50(0.55)[b]	2.07(0.39)[a]	5.87(1.86)[c]

[a–c] Different letters, within row, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher).
[1,2] Different numbers, within column, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher).
[y] Values obtained from breadmaking test.
[z] Treatments: NO: non-fermented, oven-dried; NS: non-fermented, sun-dried; FO: fermented, oven-dried; FS: fermented, sun-dried.

3. Results and discussion

3.1. Breadmaking ability

The breadmaking ability of the different samples was represented by the values of loaf expansion in Table 1. The general trend of this parameter was as follows: NO = FO < NS < FS. This sequence was in agreement with literature (Bertolini et al., 2000; Marcon et al., 2009; Mestres, Boungou, Akissoe, & Zakhia, 2000) although some actual values were lower than in the literature. The dissimilarities could be due to the use of different breadmaking protocols and/or treatment of samples used in the different studies. For instance the bread recipe in this study has content lipids due to the use of cheese as ingredient, therefore amylose lipid complexes may have formed and inhibited swelling as reported by Tester and Morrison (1992), in contrast to other studies using recipes without added lipids.

Highland genotypes displayed higher significant average values of loaf expansion than lowland's, regardless of the treatments. NO, FO, NS and FS treatments of highland genotypes were 16.8, 18.9, 30.2 and 19.1% significantly higher than those of lowland's, respectively. In lowland genotypes only FS improved breadmaking (214% significantly higher than NO). In highland genotypes both NS and FS improved breadmaking (40 and 223% significantly higher than NO, respectively). In this work, the fermentation process (FO) alone did not improve the breadmaking ability, in agreement with a previous study by Demiate et al. (2000) and in contradiction with a study by Bertolini et al. (2000), who found a significant improvement in breadmaking after treatment by lactic acid mimicking the fermentation process. In conclusion, highland genotypes appeared more sensitive to sun drying (NS and FS) than lowland ones, and the latter were sensitive to the UV-irradiation only after fermentation.

Cluster analysis and a Fisher test (not shown) carried out on the FS samples confirmed the high variability between samples in terms of breadmaking ability. A clear genotype effect was found, and two main groups were identified as follows. The high breadmaking ability group includes 4 genotypes: Cumbre 3,

Table 2
Thermal properties of native cassava starches (NO).

Genotype	Thermal properties[y]				
	T_o[y] (°C)	T_p[y] (°C)	T_c[y] (°C)	ΔH (J g^{-1})	ΔT (°C)
Lowland					
HMC-1	61.64(0.66)^{a}	66.24(0.59)^{a}	72.08(0.25)^{e}	15.28(1.73)^{a}	10.45(0.40)^{a}
CM6438-14	61.07(0.39)^{ab}	65.51(0.32)^{ab}	71.78(1.51)^{e}	16.50(2.87)^{a}	10.72(1.12)^{a}
CM4574-7	61.39(0.42)^{a}	66.10(0.21)^{a}	72.03(0.80)^{e}	17.77(1.10)^{a}	10.64(0.89)^{a}
Highland					
CM7436-7	57.38(0.64)^{efg}	61.83(0.78)^{de}	67.73(1.47)^{ab}	17.67(0.82)^{a}	10.35(1.21)^{a}
CM7438-14	58.12(0.25)^{def}	62.75(0.09)^{d}	68.78(1.13)^{bcd}	15.43(0.09)^{a}	10.66(1.39)^{a}
SM1498-4a	56.64(0.21)^{g}	60.86(0.38)^{ef}	66.40(1.58)^{a}	16.47(1.24)^{a}	9.76(1.37)^{a}
CM7138-7	58.69(0.23)^{cd}	64.19(0.30)^{c}	71.95(0.23)^{e}	16.63(2.21)^{a}	13.26(0.00)^{c}
SM7591-5	57.21(0.92)^{fg}	62.14(0.77)^{d}	68.29(1.11)^{abc}	17.07(2.71)^{a}	11.08(0.38)^{ab}
Cumbre 3	59.90(0.23)^{bc}	64.70(0.78)^{bc}	71.03(1.00)^{de}	16.91(0.46)^{a}	11.13(0.78)^{ab}
SM707-17	58.44(0.08)^{de}	62.76(0.06)^{d}	70.11(1.51)^{cde}	16.82(2.29)^{a}	11.67(1.43)^{abc}
SM1495-5	57.54(0.85)^{defg}	62.07(0.98)^{d}	68.81(0.57)^{bcd}	16.93(0.19)^{a}	11.27(1.42)^{abc}
SM1058-13	54.77(1.01)^{h}	60.26(0.53)^{f}	67.59(0.41)^{ab}	18.54(0.24)^{a}	12.83(0.60)^{bc}
Tambo 4	57.22(0.57)^{efg}	62.06(0.48)^{d}	68.76(0.74)^{abcd}	17.09(0.53)^{a}	11.54(0.18)^{abc}
Lowland	61.37(0.45)^{b}	65.99(0.42)^{b}	71.98(0.79)^{b}	16.83(1.83)^{a}	10.61(0.74)^{a}
Highland	57.56(1.35)^{a}	62.33(1.34)^{a}	68.86(1.81)^{a}	16.99(1.38)^{a}	11.30(1.26)^{a}
All genotypes	58.58(2.08)	63.30(2.01)	69.69(2.12)	16.95(1.48)	11.11(1.17)

a–h Different letters, within each column, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher). Standard deviations are given within brackets.
y Values obtained from DSC: T_o: onset gelatinization temperature; T_p: peak gelatinization temperature; T_c: conclusion temperature.

SM707-17, SM1495-5 and Tambo 4 ranging from 7.49 mL/g to 8.58 mL/g. The intermediate and lower breadmaking ability group was composed of 9 genotypes further separated into two subgroups: the intermediate breadmaking ability of 4 genotypes: CM4574-7, SM1498-4a, CM7138-7 and SM1058-13 ranging from 5.29 mL/g to 6.59 mL/g and the lower breadmaking ability consisting of 5 genotypes: HMC-1, CM6438-14, CM7436-7; CM7438-14 and S-5 ranging from 3.05 mL/g to 4.47 mL/g. Altitude was not a definite factor for predicting breadmaking ability, with one lowland genotype having good breadmaking ability (CM4574-7) and one highland genotype having poor breadmaking ability (SM7591-5). Hence both genetic and environmental factors appeared important in the control of breadmaking ability, in addition to the drying and fermentation processes. Other factors, such as the bread recipe containing lipids, may also contribute explaining the observed differences in breadmaking ability among samples.

3.2. Thermal properties

Thermal properties were investigated only in non-fermented, oven-dried (NO) samples, because a preliminary study with a limited set of samples indicated that DSC parameters did not change with fermentation or/and drying, as also indicated in literature (Bertolini, Mestres, Lourdin, et al., 2001; Bertolini, Mestres, Raffi, et al., 2001; Camargo et al., 1988). This suggests that starch degradation induced by fermentation and/or sun-drying targets mainly the amorphous regions of starch granules (Bertolini, Mestres, Raffi, et al., 2001).

The gelatinization temperatures (T_o, T_p and T_c), gelatinization temperature range (ΔT) and enthalpy (ΔH) were comparable to values reported in the literature (Table 2) (Bertolini, Mestres, Lourdin, et al., 2001; Garcia, Colonna, Bouchet, & Gallant, 1997; Marcon et al., 2009; Mestres & Rouau, 1997; Nwokocha, Aviara, Senan, & Williams, 2009).

DSC parameters are linked to the cohesion in the structure of granule (Marcon et al., 2009), the integrity and the crystalline structure of starch granule (Mestres & Rouau, 1997). T_o, T_p and T_c of lowland genotypes were 3.81, 3.66 and 3.12 °C significantly higher than those of highland. In contrast, no statistically significant difference was found between lowland and highland genotypes in terms of gelatinization enthalpy (ΔH). Thus, T_o, T_p and T_c could be used to differentiate starches from lowland and highland genotypes. The narrow gelatinization temperature range (ΔT) suggested a homogeneous size and stability of crystallites within our samples, in contrast to previous studies which found a broader gelatinization temperature range of approximately 20 °C (T_o – 61.35 °C and T_c – 81.77 °C) (Putri, Haryadi, Marseno, & Cahyanto, 2011).

As seen in Table 2, a high variability of DSC parameters was observed, indicating a pronounced genotype effect. A Fisher test (Table 2) and a cluster analysis (Fig. 1) confirmed that lowland and highland genotypes can be segregated into two separate groups based on DSC data, in particular gelatinization temperature.

Fig. 1 also shows that the best five breadmaking genotypes (CM7138-7, Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5, Tambo 4) were clustered in two neighboring groups. Hence, information on breadmaking ability might be contained within DSC parameters, although more data would be needed to establish a more conclusive correlation.

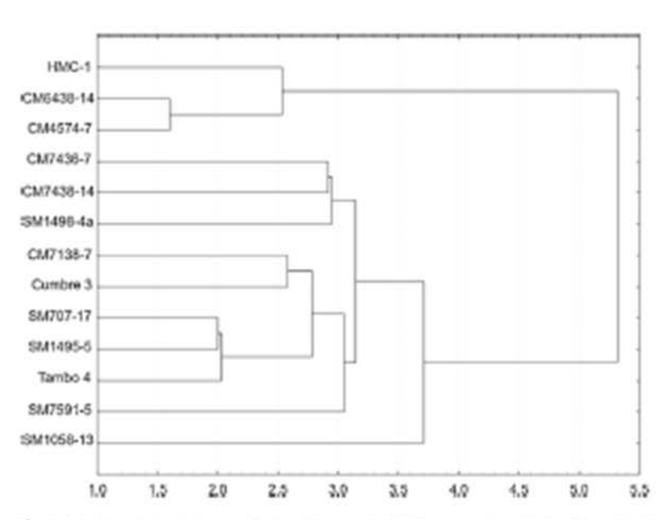


Fig. 1. Multivariate cluster analysis of the pooled DSC parameters (T_o, T_p, T_c and ΔH) identifying similarities and differences of between thirteen genotypes of cassava starch.

Table 3
Amylose content of native cassava starches (NO).

Genotype	Amylose content (%)[y]
Lowland	
HMC-1	21.7(0.4)[g]
CM6438-14	19.6(0.3)[f]
CM4574-7	21.6(0.8)[g]
Highland	
CM7436-7	19.3(0.1)[ef]
CM7438-14	20.1(0.3)[f]
SM1498-4a	18.7(0.1)[de]
CM7138-7	17.6(0.1)[c]
SM7591-5	18.5(0.2)[d]
Cumbre 3	16.7(0.5)[bc]
SM707-17	15.7(0.0)[a]
SM1495-5	16.0(0.3)[ab]
SM1058-13	19.3(0.5)[def]
Tambo 4	16.7(0.1)[bc]
Lowland	21.2(1.1)[b]
Highland	18.0(1.5)[a]
All genotypes	18.8(2.0)

[a–g] Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher). Standard deviations are given within brackets.
[y] Values obtained from DSC measurements.

3.3. Amylose content

The amylose contents of NO samples are presented in Table 3. As for DSC gelatinization experiments, only unmodified samples were investigated as the amylose content is not influenced by the different treatments according to Franco et al. (2010). The amylose contents obtained in this study were in agreement with literature (Ceballos et al., 2008; Onitilo et al., 2007; Sánchez et al., 2009).

Altitude appeared to be a determining factor for amylose content, with the lowland genotypes average (21.2%) being significantly higher than highland genotypes (18.0%). A possible explanation could be a difference in starch biosynthesis at different altitudes linked to different enzyme activities (probably related to the differences in temperature at the two locations), as well as genetic diversity.

A high variability in amylose content was found between genotypes. Hence, genotype effect was noticeable as confirmed by a Fisher test (Table 3) and a cluster analysis (not shown). These tests showed three groups: (i) a low amylose group including 4 genotypes (Cumbre 3, SM707-17, SM1495-5 and Tambo 4) ranging from 15.7 to 16.7%, (ii) an intermediate amylose group including 7 genotypes (CM6438-14, CM7436-7, CM7438-14, SM1498-4a, CM7138-7, SM7591-5 and SM1058-13) ranging from 17.6 to 20.1% and (iii) a high amylose group with 2 genotypes (HMC-1 and CM4574-7) at 21.6 and 21.7%. The four genotypes in the low amylose group matched those in the high breadmaking ability group. Hence, lower amylose contents appeared to improve breadmaking ability, which may be related to the formation of less amylose–lipid complexes in low-amylose starches (Tester & Morrison, 1992). A weak negative association of $R^2 = 0.46$ was observed between the breadmaking ability of fermented, sun-dried starches (FS, both lowland and highland) and the amylose content (measured on non-fermented, oven-dried starches, NO) (Fig. 2). When one outlier (lowland CM4574-7) was removed, the relationship improved with $R^2 = 0.71$, which tends to confirm the link between amylose content and breadmaking ability. Mestres et al. (2000) and Shirai et al. (2007) also reported a link between amylose content and loaf expansion, with low expansion for oxidized normal corn starch, and high expansion for oxidized waxy corn starch, comparable to sour cassava starch or oxidized cassava starch.

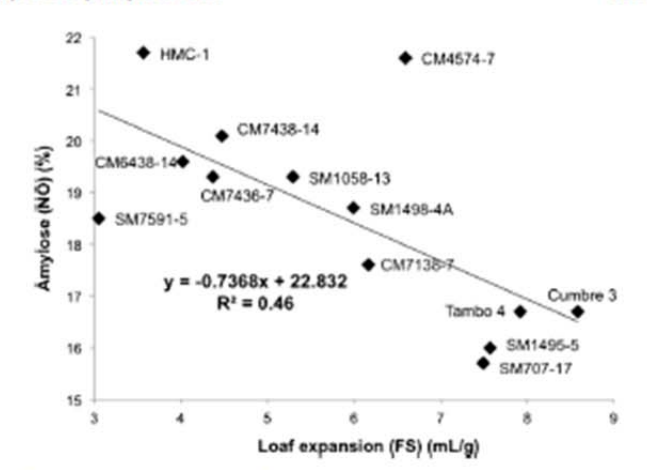


Fig. 2. Negative association ($R^2 = 0.46$) between loaf expansion of fermented, sun-dried starches (FS) and amylose content of non-fermented, oven-dried (NO) starches.

3.4. Starch granule size

The starch granular diameter ($D[4,3]$) of the 13 cassava genotypes ranged from 12.9 to 16.1 μm (Table 4), in agreement with literature data (Defloor, Dehing, & Delcour, 1998; Huang, Lu, Li, & Tong, 2007; Niba, Bokanga, Jackson, Schlimme, & Li, 2002; Nuwamanya, Baguma, Emmambux, & Taylor, 2010; Onitilo et al., 2007; Sriroth et al., 1999).

A small difference was observed in the average granular sizes of non-modified (NO) lowland and highland genotypes, which subsided after fermentation and drying treatments. A more significant difference between lowland and highland genotypes was observed in the decrease in granular size caused by the NS, FO and FS treatments (Table 4), as confirmed by Fisher tests. In lowland genotypes NS, FO and FS treatments decreased granule size by 4.6, 9.1 and 8.9% respectively compared to NO, whereas, in highland genotypes, these treatments had no influence on the granular size. To explain this, it is hypothesized that different granular structures in lowland and highland genotypes resulted in varied levels of sensitivity to treatments. In lowland genotypes, NS, FO and FS treatments only shaved off the outer layers of the granules, leading to smaller granules with mostly intact cores. In contrast, in highland genotypes, granules were attacked more homogeneously throughout their structure during fermentation, resulting in weakened granules but with a non-significant reduction in granule average diameter. The RVA and intrinsic viscosities results tended to support this hypothesis, as discussed below.

Table 4
Granular size of native, fermented and/or sun-dried cassava starches.

Genotype	Granular size (μm)[y]			
	Treatments[z]			
	NO[z]	NS[z]	FO[z]	FS[z]
Lowland	15.3(0.8)[c]	14.6(1.1)[b]	13.9(0.8)[a]	14.0(0.8)[a]
Highland	14.5(0.6)[a]	14.6(0.6)[a]	14.3(0.4)[a]	14.4(0.7)[a]

[a–c] Different letters, within row, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher). Standard deviations are given within brackets.
[y] Values obtained from laser diffractometry.
[z] Treatments: NO: non fermented, oven-dried; NS: non fermented, sun-dried; FO: fermented, oven-dried; FS: fermented, sun-dried.

Table 5
Pasting properties of native, fermented and/or sun-dried cassava starches.

Genotype/treatment^{x}	Pasting parameters^{y}								
	Pasting temperature (°C)^{y}	Peak viscosity 1 (cP)^{y}	Peak viscosity 2 (cP)^{y}	Breakdown (cP)	Relative breakdown (%)	Final viscosity (cP)^{y}	Setback (cP)	Relative setback (%)	Cooking ability (s)
Lowland									
NO^{x}	65.1(0.2)^{cd}	666(48)^{a}	914(65)^{de}	394(45)^{bc}	43.1(2.7)^{ab}	793(102)^{c}	273(79)^{c}	33.9(6.4)^{b}	263(14)^{cd}
NS^{x}	65.0(0.7)^{c}	687(38)^{a}	913(37)^{de}	345(38)^{ab}	37.8(3.6)^{a}	847(47)^{c}	279(50)^{c}	32.9(4.9)^{b}	273(12)^{cd}
FO^{x}	65.6(0.4)^{cd}	632(43)^{a}	663(40)^{ab}	310(39)^{a}	46.8(4.9)^{bc}	501(41)^{b}	149(12)^{b}	29.8(2.5)^{b}	266(24)^{cd}
FS^{x}	66.2(0.7)^{d}	–	637(36)^{a}	403(21)^{bc}	63.4(3.9)^{d}	326(45)^{a}	92(15)^{ab}	28.3(2.4)^{b}	173(16)^{a}
Highland									
NO^{x}	61.6(1.1)^{a}	835(62)^{c}	960(117)^{e}	378(42)^{b}	39.7(6.0)^{a}	844(166)^{c}	260(67)^{c}	30.8(4.0)^{b}	286(29)^{d}
NS^{x}	61.6(1.2)^{a}	834(45)^{c}	889(87)^{d}	361(68)^{b}	40.9(9.0)^{ab}	771(189)^{c}	255(88)^{c}	32.6(4.3)^{b}	270(61)^{cd}
FO^{x}	62.0(0.9)^{a}	777(46)^{b}	808(38)^{c}	425(49)^{c}	52.6(5.7)^{c}	522(64)^{b}	139(23)^{b}	26.7(3.2)^{b}	256(46)^{c}
FS^{x}	62.8(1.1)^{b}	–	718(41)^{b}	504(50)^{d}	70.4(7.8)^{e}	286(98)^{a}	52(71)^{a}	13.9(20.7)^{a}	208(16)^{b}

a–d Different letters, within column, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher). Standard deviations are given within brackets.
y Values obtained from RVA.
x Treatments: NO: non fermented, oven-dried; FO: fermented, oven-dried; NS: non fermented, sun-dried; FS: fermented, sun-dried.

3.5. *Pasting behavior*

The general shape of NO curves (Fig. 3) was similar to a standard RVA pasting profile (Franco et al., 2010; Mestres, Zakhia, & Dufour, 1997), but with two viscosity peaks. Escobar et al. (2009) asserted that only highland genotypes had two viscosity peaks whereas in our work both lowland and highland genotypes had two peaks. In general, the first peak (PV1) was lower than the second (PV2) except for 3 genotypes for which PV1 was either higher than or similar to PV2 (CM7138-7, Cumbre 3 and Tambo 4). The difference between PV1 and PV2 decreased with treatments: on NS curves, PV1 remained lower than PV2 except in two samples (CM7436-7 and SM1495-5), for which PV1 was similar to PV2. On FO curves, PV1 and PV2 were of similar magnitude in five genotypes (HMC-1, CM4574-7, CM7436-7, SM1495-5 and SM707-17), and PV1 disappeared altogether in the case of two other genotypes (CM7138-7 and Tambo 4). On FS curves only one viscosity peak remained in every genotype. This peak was arbitrarily referred to as PV2, and may be described as the result of the merger of the two peaks observed in other treatments, because the new peak time was in-between the peak times of PV1 and PV2 in other treatments (Fig. 3). As in other study (Dufour et al., 1995), the peak viscosities PV1 and PV2 decreased after the NS, FO, FS treatments, with a stronger effect of fermentation compared to UV irradiation (Table 5).

Considering the other pasting parameters of the 13 genotypes, the pasting temperature (PT) of all treatments ranged between 59.1 and 66.9 °C, well within the range of PT reported in the literature (Bertolini et al., 2000; Gomes et al., 2005). For instance according to a study of over 4000 cassava genotypes by Sánchez et al. (2009) PT ranged from 58.8 °C to 71.2 °C. For unmodified samples (NO), average PV2, BD, FV and SB were 950, 382, 832 and 263 cP, respectively. Except for SB, these results were close to the averages reported by Sánchez et al. (2009), and therefore further confirmed that the 13 genotypes in this study represented typical values for cassava.

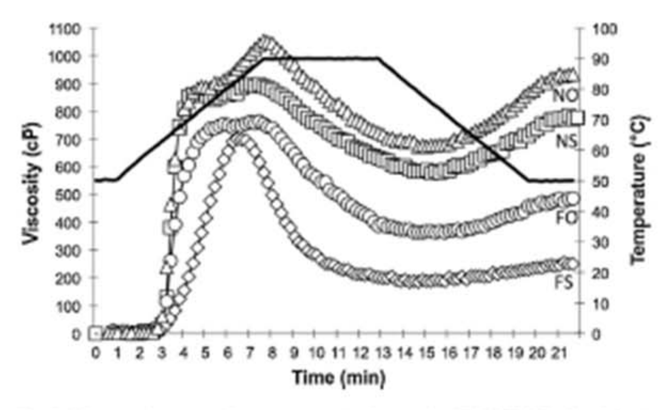


Fig. 3. Viscoamylograms of one cassava starch sample (SM 1495-5) after 4 treatments: NO (open black triangles), NS (open black squares), FO (open black circles) and FS (open black diamonds).

Statistically significant differences between lowland and highland genotypes were found, for all treatments, in pasting temperature and peak viscosity. PT was consistently 3.5 °C lower, and PV1 was consistently higher (81–168 cP higher), including the case of the single viscosity peak in FS samples, in highland compared to lowland genotypes. Hence, the pasting temperature appeared to be a relevant parameter to differentiate lowland and highland genotypes, similar to the gelatinization temperature parameter measured by DSC.

Additionally, fermentation treatments (FO and FS) resulted in significantly higher breakdowns in highland genotypes compared to lowland genotypes (BD 115 and 101 cP higher after FO and FS, respectively). This difference in breakdown may indicate that the granular structure was more severely damaged during fermentation in highland genotypes, resulting in more comprehensive granule disruption and a larger drop in viscosity after the viscosity peak is reached. This result would confirm the hypothesis introduced in Section 3.4: highland genotypes granules were damaged throughout their structure, whereas lowland genotypes were attacked only on their surface, leading to more extensive granule breakdown in highland genotypes during cooking.

With the aim of confirming our findings, a principal component analysis (PCA) was performed, using five selected RVA parameters (PT, PV2, CA, BD and FV), granular size and the bread loaf expansion values for the 13 samples (Fig. 4). The representation of the scores plot (Fig. 4a) allowed to confirm a stronger effect of fermentation over sun-drying on sour starch properties, with non-fermented samples (NO and NS) appearing mixed within one group, whereas fermented samples (FO and FS) samples were segregated along the first principal component (PC1). Nevertheless the synergy between fermentation and sun-drying was also confirmed, with FS samples markedly distributed along the second principal component (PC2), while FO samples laid close to the NO + NS samples. Additionally, a differential effect of fermentation was observed depending on the altitude of cultivation, with fermented lowland and highland samples (FO and FS) segregated along PC2. The representation of the loading plot (Fig. 4b) confirmed the observations from other

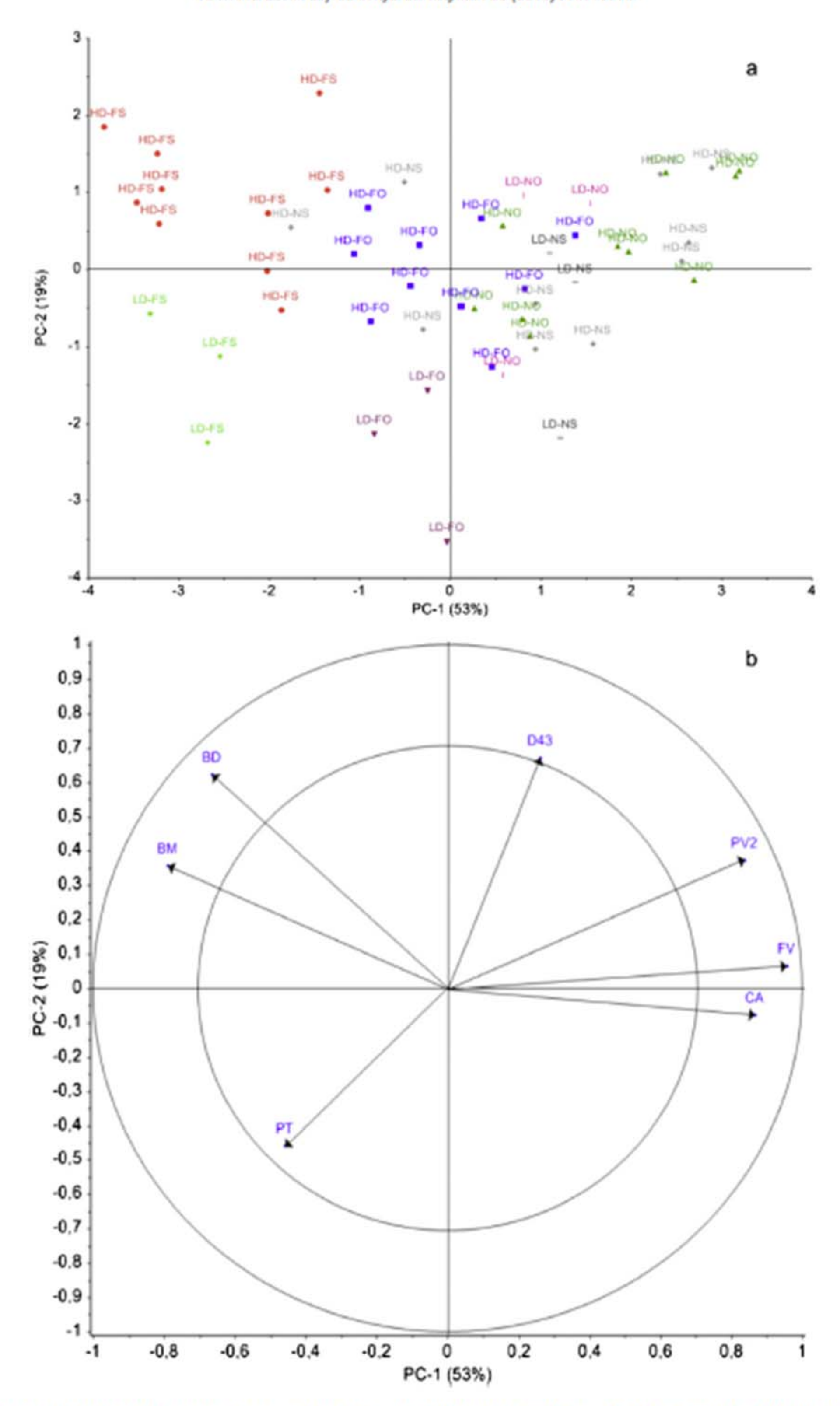


Fig. 4. Score plot (a) and loading plot (b) of principal components 1 and 2, describing the variation of the samples. HD = highland and LD = lowland. NO = non fermented, oven-dried; NS = non-fermented, sun-dried; FO = fermented, oven-dried; FS = fermented, sun-dried. BM = breadmaking ability, BD = RVA breakdown, D43 = average granule diameter, PV2 = peak viscosity 2, FV = final viscosity, CA = cooking ability, PT = pasting temperature. Colors correspond to samples grouped by altitude and post-harvest treatments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 6
Intrinsic viscosity of native fermented and/or sun-dried cassava starches.

Genotype	Intrinsic viscosity (mL/g)[y]			
	Treatments[z]			
	NO[z]	NS[z]	FO[z]	FS[z]
Lowland				
HMC-1	140.8	147.1	134.6	115.9
CM4574-7	183.6	162.6	170.7	90.5
Highland				
CM7138-7	189.7	122.0	140.0	101.6
SM7591-5	217.2	176.4	162.5	163.3
Cumbre 3	176.6	128.6	152.1	135.9
SM707-17	188.2	149.7	142.7	146.2
SM1495-5	220.0	152.8	158.5	108.0
Lowland	162.2(30.2)[b]	152.6(25.6)[b]	154.9(11.0)[b]	103.2(17.9)[a]
Highland	198.3(19.2)[b]	151.2(9.7)[a]	145.9(21.6)[a]	131.0(25.9)[a]
All genotypes	188.0(26.6)[c]	148.4(18.7)[b]	151.6(13.1)[b]	123.0(26.2)[a]

[a–c] Different letters, within row, indicate significant differences at $p < 0.05$ (Fisher). Standard deviations are given within brackets.
[y] Values obtained from intrinsic viscosity measurements.
[z] Treatments: NO: non fermented, oven-dried; NS: non fermented, sun-dried; FO: fermented, oven-dried; FS: fermented, sun-dried.

techniques, in particular the lower granule size of fermented lowland genotypes, the higher pasting temperature (PT) of lowland genotypes, the decrease in RVA viscosity (PV2, FV) with increasing strength of the treatments from NO to FS, the larger RVA breakdown (BD) and better breadmaking ability (BM) of highland FS samples. This latter observation confirmed the potential use of the RVA breakdown as predictive parameter for breadmaking ability of sour starch.

3.6. Intrinsic viscosity

Intrinsic viscosities data were determined for seven of the cassava genotypes (Table 6). The average values show the following sequence: NO > FO ≈ NS > FS. This result was in agreement with literature (Bertolini et al., 2000; Bertolini, Mestres, Colonna, & Raffi, 2001; Bertolini, Mestres, Raffi, et al., 2001; Marcon et al., 2009; Mestres & Rouau, 1997), although different protocols and/or sample treatments in previous studies resulted in different intrinsic viscosity values. The intrinsic viscosity values were sensitive to treatments: fermentation (FO) as well as sun-drying (NS) reduced the intrinsic viscosity (19.4 and 21.1% respectively compared to NO) and this effect was even more pronounced for the combined fermentation and sun-drying FS treatment (34.6% reduction). These results were in line with those determined by Fiedorowicz and Rębilas (2002) who found a molecular diminution of amylopectin in corn starch during a illumination.

The altitude may also be a determinant factor: for highland genotypes, NS and FO treatments decreased the average intrinsic viscosity by 23.8% and 26.4% respectively compared to NO, in contrast to respectively 5.9% and 4.5% for lowland genotypes. FS treatment reduced the intrinsic viscosity more effectively than other treatments and this change was similar in lowland and highland genotypes (36.4 and 33.9% respectively), compared to NO. These results further support the hypothesis that FO and NS treatments affected lowland genotypes only on the surface of the starch granules, whereas in highland genotypes modifications occurred throughout the granule structure. Thus, the core of starch granules in lowland genotypes could remain mainly unmodified while the outer layers could be removed (as indicated by the reduction in granule diameter discussed in Section 3.4), resulting in high intrinsic viscosity. In contrast, starch molecular weight of highland genotypes could be reduced throughout the granules due to depolymerisation, resulting in lower intrinsic viscosity.

In addition, an important genotype effect on intrinsic viscosity was observed regardless of the treatments (Table 6). Cluster analyses (not shown) confirmed that low, medium and high viscosity groups of cassava genotypes could be identified within each treatment (NO, NS, FO, FS). However, no correlation was found between breadmaking ability and intrinsic viscosity data.

4. Conclusion

The influence of genotypes, altitude of cultivation and post-harvest treatments (fermentation and sun-drying) on the breadmaking ability of 13 cassava starches from Colombia was analyzed. Post-harvest treatments were prevailing factors in improving breadmaking ability, while the genotype factor had a smaller influence. Among post-harvest treatments, fermentation had a more pronounced effect than sun-drying, in particular on starch granule structure as evidenced by granule size analysis and RVA parameters such as PV1 and PV2. The combination of both treatments was nevertheless necessary to obtain the highest dough expansion. These results confirm several previous studies (Bertolini et al., 2000; Bertolini, Mestres, Lourdin, et al., 2001; Marcon et al., 2009; Mestres et al., 1997; Guerra Dias et al., 2011), which showed that fermentation and sun-drying cause oxidative depolymerization and decrease RVA and intrinsic viscosities, and consequently increase loaf expansion. However no definitive linear correlation was found between depolymerization (measured by intrinsic viscosity) and expansion. One possible explanation, suggested by our results, is that other factors are at play.

In particular, the comparison of 13 different genotypes in this study showed that amylose content influenced negatively dough expansion, possibly because of amylose–lipid complex formation. Hence, selecting low-amylose cassava genotypes may help to obtain more consistent breadmaking quality. In particular, expansion tests with recently discovered amylose-free cassava genotypes (Rolland-Sabaté et al., 2013) could confirm this hypothesis.

Other physicochemical parameters did not show direct correlations with expansion properties. However, differences in sensitivity to the fermentation treatment for lowland and highland genotypes were apparent, in particular, through particle size, RVA and intrinsic viscosity analyses. These observations led to the idea that to understand the phenomena underpinning sour cassava starch breadmaking ability, it is important to make a distinction between molecular and supra-molecular levels.

Firstly at molecular level, fermentation and sun-drying caused depolymerization for all genotypes, which helped increase loaf volume due to the reduced viscosity of the dough during expansion, as predicted by the model of bubble expansion proposed by Fan, Mitchell and Blanshard (1999). Different models (Hailemariam, Okos, & Campanella, 2007) predict that other phenomena can also have significant effects on loaf expansion at different stages of baking, including mass transfers, such as migration of CO_2 or water from the surrounding matrix to the expanding bubbles, inertia and surface tension. Hence further work could focus on determining which of these phenomena are dominant for the expansion of sour cassava dough.

Secondly, at supra-molecular level, our results point to the hypothesis that depolymerization was different for lowland and highland genotypes: Lowland genotypes were attacked mainly on the surface, resulting in smaller but mainly intact granules containing high molecular weight starch; whereas highland genotypes underwent depolymerization throughout the granules, which was key to enhance breadmaking, due to the reduced molecular weight of starch, and possibly a more extensive granule collapse during

gelatinization and better film formation around the bubbles of steam driving dough expansion.

Further work to characterize starch solubility and the proportions of A and B crystalline types could advance the understanding of molecular and supra-molecular level phenomena controlling the emergence of breadmaking properties during fermentation and sun-drying. The combination of cassava genotypes and fermentation and drying operations to tailor the properties of sour cassava starch is expected to open new avenues for developments of gluten-free ingredients for bakery products (bread, pizza dough, etc.) and expanded snacks based on cassava starch.

Acknowledgments

The authors want to acknowledge the following contributions: SENESCYT of Ecuador government for providing funding for a doctoral fellowship. CIRAD, CIAT and UM1 for providing funding and facilities for laboratory work. Agnès Rolland-Sabaté (INRA, France), Sandra Hill (University of Nottingham, UK), Olivier Gibert and Christian Mestres (CIRAD, France) for their contributions to scientific discussions on molecular size, thermal analyses and granule structure. Julien Ricci and Françoise Matencio (CIRAD, France) for technical support. Gustavo Jaramillo from the cassava breeding project at CIAT for the development and availability of improved cassava germplasm (both for highland and lowland environments).

References

Bertolini, A. C., Mestres, C., & Colonna, P. (2000). Rheological properties of acidified and UV-irradiated starches. *Starch – Stärke*, *52*(10), 340–344.

Bertolini, A. C., Mestres, C., Colonna, P., & Raffi, J. (2001). Free radical formation in UV- and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, *44*(3), 269–271.

Bertolini, A. C., Mestres, C., Lourdin, D., Valle, G. D., & Colonna, P. (2001). Relationship between thermomechanical properties and baking expansion of sour cassava starch (Polvilho azedo). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(4), 429–435.

Bertolini, A. C., Mestres, C., Raffi, J., Buléon, A., Lerner, D., & Colonna, P. (2001). Photodegradation of cassava and corn starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 675–682.

Camargo, C., Colonna, P., Buleon, A., & Richard-Molard, D. (1988). Functional properties of sour cassava (Manihot utilissima) starch: Polvilho azedo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *45*(3), 273–289.

Cárdenas, O. S., & de Buckle, T. S. (1980). Sour cassava starch production: A preliminary study. *Journal of Food Science*, *45*(6), 1509–1512.

Cavallini, C. M., & Franco, C. M. L. (2010). Effect of acid-ethanol treatment followed by ball milling on structural and physicochemical characteristics of cassava starch. *Starch – Stärke*, *62*(5), 236–245.

Ceballos, H., Sánchez, T., Denyer, K., Tofiño, A. P., Rosero, E. A., Dufour, D., et al. (2008). Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (Manihot esculenta Crantz). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 7215–7222.

Cereda, M. P. (1973). *Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca*. Botucatu, São Paulo, Brazil: Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas. Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) [Ph.D. dissertation].

Defloor, I., Dehing, I., & Delcour, J. A. (1998). Physico-chemical properties of cassava starch. *Starch – Stärke*, *50*(2–3), 58–64.

Demiate, I. M., Dupuy, N., Huvenne, J. P., Cereda, M. P., & Wosiacki, G. (2000). Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, *42*(2), 149–158.

Dufour, D., Brabet, C., Zakhia, N., & Chuzel, G. (1995). Influence of fermentation and sun-drying on the breadmaking capacity of cassava sour starch. In E. T. Agbor, A. Brauman, D. Griffon, & S. Trèche (Eds.), *Transformation alimentaire du manioc* (pp. 399–416). Paris: ORSTOM.

Dufour, D., Larsonneur, S., Alarcon Morante, F., Brabet, C., & Chuzel, G. (1996). Improving the breadmaking potential of cassava sour starch. In D. Dufour, G. M. O'Brien, & R. Best (Eds.), *Cassava flour and starch: Progress in research and development* (pp. 133–142). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.

Escobar, A., Dufour, E., Sanchez, T., Giraldo, A., & Dufour, D. (2009). Evaluacion de yuca (Manhiot esculenta Crantz) de altura para la produccion de almidon en Colombia. Alimentos Hoy: Revista de la Asociacion colombiana de ciencia y tecnologia de alimentos, 2009. (18). In *Congreso Iberoamericano de Ingenieria en Alimentos*, Bogota, Colombia 06–09 September.

Fan, J., Mitchell, J. R., & Blanshard, J. M. V. (1999). A model for the oven rise of dough during baking. *Journal of Food Engineering*, *41*, 69–77.

FAO. (2004). Domestic market opportunities. In *Global cassava market study business opportunities for the use of cassava* (6th ed., pp. 184). Rome: FAO.

Fiedorowicz, M., & Rębilas, K. (2002). Physicochemical properties of waxy corn starch and corn amylopectin illuminated with linearly polarised visible light. *Carbohydrate Polymers*, *50*(3), 315–319.

Franco, C. M. L., Ogawa, C., Rabachini, T., Rocha, T. d. S., Cereda, M. P., & Jane, J.-l. (2010). Effect of lactic acid and UV irradiation on the cassava and corn starches. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*, 443–454.

Garcia, V., Colonna, P., Bouchet, B., & Gallant, D. J. (1997). Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. *Starch – Stärke*, *49*(5), 171–179.

Gomes, A. M. M., Mendes da Silva, C. E., & Ricardo, N. M. P. S. (2005). Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydrate Polymers*, *60*(1), 1–6.

Guerra Dias, A. R., Zavareze, E. d. R., Elias, M. C., Helbig, E., da Silva, D. O., & Ciacco, C. F. (2011). Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidised with sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 268–275.

Hailemariam, L., Okos, M., & Campanella, O. (2007). A mathematical model for the isothermal growth of bubbles in wheat dough. *Journal of Food Engineering*, *82*, 466–477.

Harding, S. E. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *68*(2–3), 56.

Huang, Z.-Q., Lu, J.-P., Li, X.-H., & Tong, Z.-F. (2007). *Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch* (Vol. 68) Kidlington, England: Elsevier.

Jinapong, N., Suphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, *84*(2), 194–205.

Kent, N. L. (1985). *Technical compendium on composite flours: Technologies available for application*. Etiophia: FAO, United Nation Economic Commission for Africa.

Marcon, M. J. A., Kurtz, D. J., Raguzzoni, J. C., Delgadillo, I., Maraschin, M., Soldi, V., et al. (2009). Expansion properties of sour cassava starch (Polvilho Azedo): Variables related to its practical application in bakery. *Starch – Starke*, *61*(12), 716–726.

Mestres, C., Boungou, O., Akissoe, N., & Zakhia, N. (2000). Comparison of the expansion ability of fermented maize flour and cassava starch during baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(6), 665–672.

Mestres, C., & Rouau, X. (1997). Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *74*(2), 147–155.

Mestres, C., Rouau, X., Zakhia, N., & Brabet, C. (1996). Physicochemical properties of cassava sour starch. In D. Dufour, G. M. O'Brien, & R. Best (Eds.), *Cassava flour and starch: Progress in research and development* (pp. 143–149). Cali, Colombia: CIAT-CIRAD.

Mestres, C., Zakhia, N., & Dufour, D. (1997). Functional and physico-chemical properties of sour starch. In P. J. Frazier, P. Richmond, & A. M. Donald (Eds.), *Starch: Structure and functionality* (pp. 42–50). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. Special publication no. 205.

Niba, L. L., Bokanga, M. M., Jackson, F. L., Schlimme, D. S., & Li, B. W. (2002). Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various Manihot esculenta (cassava) genotypes. *Journal of Food Science*, *67*(5), 1701–1705.

Nuwamanya, E., Baguma, Y., Emmambux, N., & Taylor, J. (2010). Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan varieties and their progenies. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *2*(1), 1–11.

Nwokocha, L. M., Aviara, N. A., Senan, C., & Williams, P. A. (2009). A comparative study of some properties of cassava (Manihot esculenta, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carbohydrate Polymers*, *76*(3), 362–367.

Onitilo, M. O., Sanni, L. O., Oyewole, O. B., & Maziya-Dixon, B. (2007). Physicochemical and functional properties of sour starches from different cassava varieties. *International Journal of Food Properties*, *10*(3), 607–620.

Putri, W. D. R., Haryadi, D. W., Marseno, & Cahyanto, M. N. (2011). Effect of biodegradation by lactic acid bacteria on physical properties of cassava starch. *International Food Research Journal*, *18*(3), 1149–1154.

Rolland-Sabaté, A., Sanchez, T., Buléon, A., Colonna, P., Ceballos, H., Zhao, et al. (2013). Molecular and supra-molecular structure of waxy starches developed from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 1451–1462.

Sánchez, T., Mafla, G., Morante, N., Ceballos, H., Dufour, D., Calle, F., et al. (2009). Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Starch – Stärke*, *61*(5), 310 [Erratum: Starch/Stärke (61) 310 (2009)].

Shirai, M. A., Haas, A., Ferreira, G. F., Matsuguma, L. S., Franco, C. M. L., & Demiatte, I. M. (2007). Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos modificados por tratamento oxidativo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *27*(2), 239–247.

Sokal, R. R., & Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *The University of Kansas Scientific Bulletin*, *38*, 1409–1438.

Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawong, K., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (1999). Cassava starch granule structure–function properties: Influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, *38*(2), 161–170.

Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1992). Swelling and gelatinization of cereal starches. III. Some properties of waxy and normal nonwaxy barley starches. *Cereal Chemistry*, *69*(6), 654–658.
Vatanasuchart, N., Naivikul, O., Charoenrein, S., & Sriroth, K. (2005). Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohydrate Polymers*, *61*(1), 80–87.
Westby, A., & Cereda, M. P. (1994). Production of fermented cassava starch (polvilho azedo) in Brazil. *Tropical Science*, *34*(2), 203–210.
Zakhia, N., Dufour, D., Chuzel, G., & Griffon, D. (1996). Review of sour cassava starch production in rural Colombian areas. *Tropical Science*, *36*(4), 247–255.

Facteurs déterminants du pouvoir de panification de l'amidon de manioc modifié par fermentation et irradiation UV.

Compte tenu que la capacité de panification de *l'amidon aigre*, amidon de manioc modifié par fermentation et irradiation UV, n'a pas encore été complètement élucidée, l'influence du génotype et les traitements post-récolte sur le pouvoir de panification de l'amidon aigre a été l'objectif de ce travail. 13 génotypes de manioc de Colombie, cultivés à 1000 m. et 1700 m.p.n.m (3 de plaine et 10 d'altitude, respectivement) modifiés par fermentation (0 ou 30 jours) et séchage (four ou soleil) ont été étudiés. Les analyses de la taille des granules, la viscosité d'empesage RVA et la viscosité intrinsèque révèlent que les traitements post-récolte ont été les facteurs prépondérants en vue de l'amélioration de la capacité de panification tandis que le facteur génotype a présenté une influence moins importante. Parmi les traitements post-récolte, la fermentation a présenté un effet plus prononcé sur la structure des granules d'amidon, que le séchage au soleil. Cependant, la combinaison de ces deux traitements a été nécessaire pour obtenir une forte capacité de panification. L'effet d'altitude de culture a été mis en évidence lors de la fermentation par des sensibilités différentes trouvées entre les granules de plaine et d'altitude (exocorrosion et endocorrosion, respectivement). Les génotypes d'altitude, donc, ont montré une bonne capacité de panification. Néanmoins, d'autres facteurs entrent en jeu, la teneur en amylose mesurée par DSC a influencé négativement l'expansion de la pâte, probablement en raison de la formation de complexes amylose-lipide. Par conséquent, la combinaison de génotypes de manioc (la teneur en amylose principalement) et les traitements post-récolte sont un élément clé de la capacité de panification de l'amidon aigre. Ces contributions peuvent aider à l'établissement de standards de qualité de l'amidon aigre vis à vis de leur potentielle utilisation dans la fabrication des produits sans-gluten.

Mots-clés : amidon aigre, capacité de panification, fermentation, irradiation UV, sans gluten.

Determinant factors affecting breadmaking ability of cassava starch modified by fermentation and UV irradiation.

The breadmaking ability of *sour cassava starch*, cassava starch modified by fermentation and UV irradiation, have not been yet fully elucidated. The influence of genotype and post-harvest treatments on expansion ability of sour cassava was the objective of this work. Thirteen cassava genotypes have been studied. All genotypes proceeded from Colombia. Two altitudes of origin (1000 m. and 1700 m.a.s.l. refered to respectively as lowland and highland), fermentation treatments (0 or 30 days) and drying treatments (oven or sun) were considered. Analyses of the granule size, RVA pasting behavior and intrinsic viscosity were analysed as indicators of breadmaking ability. Results showed that post-harvest treatments were prevailing factors in improving breadmaking ability while the genotype factors had a smaller influence. Among post-harvest treatments, fermentation had a greater influence than sun-drying on these indicators, in particular on starch granular structure. The combination of both treatments was needed to obtain a high capacity bread. Furthermore, the altitude of origin of cassava genotypes was observed to affect the fermentation process: different sensitivities to fermentation were found between granules of lowland and highland (exocorrosion and endocorrosion, respectively). Highland genotypes showed a better breadmaking ability. Other influencing factor related to genotype was the amylose content measured by DSC: it negatively influenced the expansion of the dough, probably due to the formation of amylose-lipid complex. As a conclusion, the combination of cassava genotypes (mainly amylose content) and post-harvest treatment is key for expansion ability of sour starch. This knowledge is a first, essential step to provide quality standards for sour starch, targeted particularly for use in gluten-free products.

Keywords: sour starch, breadmaking ability, fermentation, UV irradiation, gluten-free.

UMR QualiSud – CIRAD. TA B95/16-73 rue Jean-François BRETON 34398 Montpellier Cedex 5